

Evaluierung des linksventrikulären Remodelings
nach Myokardinfarkt in NLRP10^{-/-} Knockout Mäusen
mittels MRT und PET

von Anna Ines Bartels

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Evaluierung des linksventrikulären Remodelings
nach Myokardinfarkt in NLRP10^{-/-} Knockout Mäusen
mittels MRT und PET

von Anna Ines Bartels, geb. Voelchert

aus München

München 2016

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Chirurgie der kleinen Haus- und Heimtiere

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.- Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg

Angefertigt am Institut für Nuklearmedizin und am Zentrum für Präklinische
Forschung des Klinikums Rechts der Isar der Technischen Universität München

Mentor: PD Dr. habil. Christine Baumgartner

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.- Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg

Korreferent: Univ.- Prof. Dr. Cordula Poulsen Nautrup

Tag der Promotion: 11. Februar 2017

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	12
II.	LITERATURÜBERSICHT	15
1.	Myokardinfarkt	15
1.1.	Pathogenese des akuten Myokardinfarkts	15
1.2.	Remodeling und chronisches Herzversagen	16
1.3.	Nucleotide-Binding and Oligomerization Domain-like Rezeptoren (NLRs) ..	17
1.3.1.	Nod-like Receptor Protein 3 (NLRP3)	19
1.3.2.	Nod-like Receptor Protein 10 (NLRP10)	22
2.	Myokardiale molekulare Bildgebung in der Nuklearmedizin.....	24
2.1.	Einsatz der Magnetresonanztomographie (MRT) nach einem MI zur Messung des endsystolischen Volumens (ESV) und des enddiastolischen Volumens (EDV) und der Auswurfraction (LVEF)	25
2.2.	Einsatz der Positronenemissionstomographie (PET) nach einem MI zur Messung der Infarktgröße (%LV).....	26
III.	MATERIAL UND METHODEN.....	29
1.	Versuchsaufbau	29
2.	Versuchstiere.....	30
2.1.	Mauslinie NLRP10 ^{fl/fl}	30
2.2.	Kontrollgruppe	31
3.	Versuchstierhaltung	31
4.	Operativ induzierter Myokardinfarkt.....	32
4.1.	Anästhesie und Intubation	32
4.2.	Myokardinfarkt.....	34
4.3.	Postoperative Behandlung/ Schmerztherapie	40
5.	In vivo Bildgebung.....	40
5.1.	Magnetresonanztomographie (MRT) der NLRP10 Mausgruppe und der WT Kontrollgruppe zur Messung der Auswurfraction (LVEF) und des endsystolischen Volumens (ESV) und des enddiastolischen Volumens (EDV)	40

5.2.	Auswertung des enddiastolischen Volumens (EDV) des endsystolischen Volumens (ESV) und der Auswurfraction (LVEF), mittels MRT der NLRP10 Mausgruppe und der WT Kontrollgruppe	44
5.3.	Positronenemissionstomographie (PET) der NLRP10 Mausgruppe und der WT Kontrollgruppe zur Messung der Infarktgröße (%LV)	46
5.4.	Auswertung der Infarktgröße (%LV) mittels PET der NLRP10 Mausgruppe und der WT Kontrollgruppe	48
6.	Korrelation der Infarktgröße (%LV) der PET und der Histologie durch histologische Aufarbeitung des Mäuseherzens	50
7.	Korrelation der LVEF Berechnung	55
8.	Statistische Auswertung	56
IV.	ERGEBNISSE	58
1.	Mortalität während des Studienverlaufs anhand einer Kaplan-Meier-Kurve	58
2.	Bildgebung.....	59
2.1.	Ergebnisse der Berechnung des enddiastolischen Volumens (EDV) und des endsystolischen Volumens (ESV) mittels MRT	59
2.2.	Ergebnisse der Berechnung der Auswurfraction (LVEF) mittels MRT	65
2.3.	Infarktgrößenbestimmung mittels Positronenemissionstomographie (PET) ..	67
3.	Körpergewicht (KGW) / Herzgewicht (HGW) / Tibiallänge (TL).....	68
V.	DISKUSSION	74
1.	Diskussion der Methodik	74
1.1.	LAD Ligation	74
1.2.	Krankheitsmodell NLRP10-/-	75
2.	Diskussion der Ergebnisse	76
2.1.	Erhöhte Mortalität der NLRP10-/- Mäuse.....	76
2.2.	Vergleichbare Zunahme des EDV/ESV	78
2.3.	Signifikante Funktionalitätsabnahme von NLRP10-/- in der LVEF	79
2.4.	Vergleichbare Infarktgröße zwischen NLRP10-/- und WT Mäusen.....	81
2.5.	Vergleichbares KGW/HGW/TL über den gesamten Studienverlauf	83
3.	Ausblick	84

VI.	ZUSAMMENFASSUNG.....	87
VII.	SUMMARY	89
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS.....	91
IX.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	104
X.	DANKSAGUNG	108

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

[¹⁸ F]FDG	¹⁸ Fluorodesoxyglucose
%LV	Infarktgröße in % vom linken Ventrikel
AK	Antikörper
AMI	Akuter Myokardinfarkt
ApoE-/-	Apolipoprotein E-Deficient
ASC	Apoptosis-associated Speck-like Protein containing a CARD Domain
ATP	Adenosintriphosphat
BIR	Baculovirus inhibitory Repeat Domain
CARD	Caspase-activating and Recruitment Domain
CARD	Caspase recruitment Domain
CASP1	Cysteine-dependent-Aspartate-directed-Protease-1
CT	Computertomographie
DAB	Diaminobenzidine
DAMPs	Damage-Associated Molecular Patterns
DC	Dendritische Zellen
DOCK8	Guanine nucleotide exchange factor
EDV	Enddiastolisches Volumen
EF	Auswurfraction
ESV	Endsystolisches Volumen
Gd-DTPA	Gadopentetate dimeglumine
HE	Hämatoxylin-Eosin
HGW	Herzgewicht
HWZ	Halbwertszeit
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
I/R	Ischämie/Reperfusion
ICR	Interkostalraum

KGW	Körpergewicht
KM	Kontrastmittel
KO	Knockout
LAD	Left anterior descending artery
LGE	Late-Gadolinium-Enhancement
LOR	Line of response
LPS	Lipopolysaccharide
LRRs	Carboxy-Terminal Leucine-rich Repeats
LV	Linker Ventrikel/linksventrikulär
LVEF	Linksventrikuläre Auswurf fraktion
MI	Myokardinfarkt
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natriumchlorid
NBD	Nucleotide-binding Domain
NCM	Non-Cardiomyocyte Cell Fraction
NLRP10	Nod-like Receptor Protein 10, PYNOD
NLRP3	Nod-like Receptor Protein 3
NLRs	Nucleotide-Binding and Oligomerization Domain-like Receptors
NOD	Nucleotide-Oligomerisation Domain
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PCI	Pain-to-ballon
PET	Positronenmissionstomographie
post OP	post operationem
PRRs	Pattern-Recognition Receptors
PYD	Pyrin-Domain
R ²	Determinationskoeffizient

ROI	Region of Interest
SD	Standardabweichung
SHAM	Scheinoperiert
SPECT	Einzelphotonen- Emissionscomputer Tomographie
SPF	Spezifisch-pathogenfrei
SV	Schlagvolumen
Th	T-Helferzelle
TL	Tibiallänge
vs	Versus
μl	Mikroliter

I. EINLEITUNG

Der Myokardinfarkt (MI) und die sich daraufhin entwickelnde chronische Herzinsuffizienz gehören unverändert zu den häufigsten Erkrankungen beim Menschen weltweit und weisen eine sehr hohe Morbidität sowie Mortalität auf (WHO 2012).

Laut statistischem Bundesamt stellten 2013 40% der Todesursachen in Deutschland Herz-Kreislaufkrankungen dar. Rund 355 000 Menschen starben an einer kardiovaskulären Erkrankung, davon etwa 72 000 an einer chronisch ischämisch bedingten Herzkrankheit und 55 000 an einem akuten Myokardinfarkt (Bundesamt 2014). Durch verbesserte Behandlungsmöglichkeiten - basierend auf besserem Wissen um die Ursachen, die akutmedizinischen Behandlungen und um die Auswirkungen eines Infarktes - können gut ausgebildete Sanitäter und Ärzte bei einem Myokardinfarkt-Patienten sofort mit einer initialen medikamentösen Therapie beginnen und somit die Überlebenschancen der Patienten erhöhen. Der Ausbau zertifizierter Herzinfarkteinheiten (Chest Pain Units) trägt durch verbesserter Abläufe und Diagnosestellung durch EKG, Blutparameter, sowie Ultraschall zu einer frühen Diagnosestellung inklusive einer eventuell notwendigen Intervention mittels Katheterisierung der blockierten Arterie bei. Zur Testung myokardialer Ischämie kommen moderne Bildgebungsmodalitäten wie Magnetresonanztomographie (MRT), Positronenemissionstomographie (PET) oder der Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (SPECT) zum Einsatz. Durch kürzere Zeiten bis zum pain-to-balloon (PCI), besserer Medikation und besserer Schulung kam es innerhalb der letzten Jahre zu einer deutlichen Reduzierung der Mortalitätsrate beim akuten Myokardinfarkt (Steg et al. 2012).

Wenn die Erfolge der verminderten Mortalität der akuten Myokardinfarkte dem weiteren Anstieg der chronischen Herzinsuffizienz als Folge eines Myokardinfarktes gegenübergestellt werden, ist nachvollziehbar, dass die Bedeutung der erfolgreichen Therapie der post MI Patienten weiter in der Vordergrund tritt. Denn Patienten, die an chronischem Herzversagen erkranken, leiden unter einer enormen Beeinträchtigung der Lebensqualität und –erwartung (Velagaleti et al. 2008). Der Grund für die hohe Mortalität auf Grund einer Herzinsuffizienz ist nicht zuletzt der Mangel an kausalen Therapieoptionen.

Als Hauptursache einer Herzinsuffizienz nach einem Myokardinfarkt wird der

fortschreitende Umbau des linken Ventrikels, das sogenannte linksventrikuläre Remodeling, gesehen (Cohn et al. 2000). Trotz Kenntnis der Umbauvorgänge nach einem MI im linken Ventrikel ist es weiterhin nicht oder nur unzureichend möglich, die Entwicklung einer chronischen Herzinsuffizienz zu verhindern. Wie in den letzten Jahren in der Fachliteratur immer häufiger beschrieben, rückt der Auslöser des kardialen Remodelings, die Entzündungsreaktion nach einem akutem MI, in den Fokus der Infarkt-Forschung (Frangogiannis 2014). Nach einem MI wird eine Entzündungsreaktion im Myokard initiiert, welche durch eine Akkumulation von Leukozyten im infarzierten Gewebe und durch die Produktion von Zytokinen (wie z.B. den Chemokinen) gekennzeichnet ist (Saxena et al. 2015).

Die vorliegende Arbeit befasst sich daher mit der Fragestellung des Einflusses des Proteins Nod-like Receptor Protein 10 (NLRP10), zur Familie der Nucleotide-Binding and Oligomerization Domain-like Receptors (NLRs) gehörend, auf das linksventrikuläre Remodeling nach einem MI. Durch die Forschungsgruppe von PD Dr. Olaf Groß am Institut für Klinische Chemie der TU München konnte eine Mauslinie generiert werden, die einen veränderten NLRP10-Genlocus trägt (NLRP10^{fl/fl}). Diese genetische Veränderung ermöglicht die gewebsspezifische und die globale Gendeletion von NLRP10. In vitro durchgeführte Vorarbeiten haben ergeben, dass NLRP10 spezifisch im Herzen in hohem Maße exprimiert wird, sowohl von Immunzellen als auch von Kardiomyozyten (Imamura et al. 2010). Diese Ergebnisse legen eine mögliche Verbindung zu den postischämischen Abläufen nach einem Infarktgeschehen nahe. Daher soll die neu generierte Mauslinie im Rahmen dieser Doktorarbeit hinsichtlich Remodeling nach einem MI anhand bildgebender Verfahren untersucht werden. Die Funktions- und Wirkweise von NLRP10 wurde bisher noch nie in einem Myokardinfarktmodell untersucht. Die Ergebnisse werden zum besseren Verständnis der Rolle des NLRP10 beitragen und können im besten Falle direkte Implikationen für die Therapie der Herzinsuffizienz nach einem Myokardinfarkt ergeben.

Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss der ablaufenden Entzündungsreaktionen auf den Schweregrad des daraufhin eintretenden Remodelings zu erforschen.

Durch den Vergleich eines NLRP10 defizienten Krankheitsmodells, nachfolgend

NLRP10^{-/-} genannt, mit einer Kontrollgruppe, können mögliche Unterschiede im linksventrikulären Remodeling nach Myokardinfarkt, im speziellen die Infarktgröße des linken Ventrikels (%LV), die linksventrikuläre Auswurfraction (LVEF), das enddiastolische Volumen (EDV) und das endsystolische Volumen (ESV), mit Hilfe von MRT und PET untersucht werden.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Myokardinfarkt

1.1. Pathogenese des akuten Myokardinfarkts

Unter einem akuten Myokardinfarkt versteht man eine ischämisch bedingte Herzmuskelgewebsnekrose. Die Nekrose, bestehend aus untergegangenen Kardiomyozyten, wird durch eine anhaltende Ischämie des Gewebes hervorgerufen, die durch eine Minderdurchblutung entsteht (Antman et al. 2000). Meist wird diese Minderdurchblutung durch einen thrombotischen Verschluss infolge atherosklerotischer Veränderungen der Koronargefäße verursacht. Auf den teilweise oder vollständigen Gefäßverschluss folgen Abläufe, die man in drei sich überschneidende Phasen beschreiben kann. Nach einem akuten MI befindet sich das betroffene Gewebe in einer nekrotischen Phase, in der es zu Zelltod aufgrund von Nekrose kommt. Durch sog. Warnsignale, wie z. B. Interleukin-1 α oder eRNA, der nekrotisch gewordenen Kardiomyozyten kommt es zur Aktivierung der angeborenen Immunantwort, welche zu einer ausgeprägten Entzündungsreaktion führt. Dadurch werden Chemokine und Zytokine (z. B. Interleukin-1 β (IL-1 β)) synthetisiert. Ein verlängertes oder exzessives Vorhandensein von IL-1 β führt zu weitreichenden Gewebeschäden und wird mit einer Vielzahl von akuten und chronischen Entzündungsreaktionen assoziiert (Abderrazak et al. 2015). Proinflammatorische Zytokine wie der Tumornekrose Faktor (TNF)- α , (IL)-1 β und IL-6, die von Leukozyten, Fibroblasten, Endothelzellen und Kardiomyozyten freigesetzt werden, induzieren Adhäsionsmoleküle und die Synthese von Chemokinen, die schließlich zur Einwanderung von Leukozyten in das Infarktareal führen (Saxena et al. 2015). Diese Chemokine führen letztendlich zu einer Extravasation von Entzündungszellen ins infarzierte Areal. Die Entzündungsphase führt zu einer Eliminierung nekrotischer Zellen im Infarktareal und bereitet das infarzierte Gewebe auf die Proliferationsphase vor. Während der Proliferationsphase werden durch Monozyten und Makrophagen-subpopulationen Wachstumsfaktoren ausgeschüttet, die vor allem Myofibroblasten und Endothelzellen bereitstellen. Das Ende der Entzündungsphase ist durch die Apoptose der meisten reparativen Zellen gekennzeichnet (Frangogiannis 2014).

Durch diesen Umbau des Gewebes entsteht eine fibröse Narbe, welche nicht mehr im Stande ist die ursprünglichen Funktionen des Myokardgewebes zu erfüllen (Bonvini 2005). Diese strukturellen Veränderungen im linken Ventrikel werden als kardiales Remodeling bezeichnet (Dixon und Spinale 2011).

1.2. Remodeling und chronisches Herzversagen

Schon 1987 wurde der Begriff des kardialen Remodelings mit einer Dilatation, einer ballonartigen strukturellen Veränderung des linken Ventrikels und einer Hypertrophie der Kardiomyozyten, beschrieben (Pfeffer und Pfeffer 1987).

Das Remodeling ist der entscheidende Faktor für die Entstehung des Herzversagens nach Myokardinfarkt.

Dieser komplexe Prozess ist charakterisiert durch den Versuch des Körpers, das verlorengegangene Myokardgewebe zu reparieren bzw. zu ersetzen. Hierbei kommt es zu einer Veränderung in der Form des linken Ventrikels (LV), vor allem im Sinne einer deutlichen Dilatation (Cohn et al. 2000).

Schätzungen zufolge stirbt die Hälfte aller Patienten mit chronischem Herzversagen nach einem Myokardinfarkt innerhalb von fünf Jahren. Mehr als die Hälfte der Patienten, bei denen schweres Herzversagen diagnostiziert wurde, stirbt innerhalb eines Jahres (Velagaleti et al. 2008). Die Mortalität aufgrund eines chronischen Herzversagens nach einem Myokardinfarkt ist höher als bei vielen Krebsarten. Therapien, die das Remodeling mindern, besonders ACE-Hemmer und Beta-Blocker, können die Prognose verbessern, werden jedoch erst eingesetzt, wenn der Patient klinische Symptome präsentiert (Dickstein et al. 2008). Somit erfolgt der Einsatz einer Therapie zu einem Zeitpunkt zu dem die - meist irreversiblen - Umbauvorgänge bereits stattgefunden haben.

Das kardiale Remodeling nach akutem Myokardinfarkt hängt von einer Vielzahl von Faktoren ab. Dazu zählen u.a. Größe und Lokalisation des Infarktes sowie die Volumen- und Druckverhältnisse im Herzkreislaufsystem (Cohn et al. 2000).

Die genaue Betrachtung der auf die Entzündungsphase folgenden, frühen proliferativen Phase im Tiermodell (Nager 48h-5d post MI, große Säuger 4d-14d post MI) zeigt, dass vor allem Fibroblasten dominieren. Durch Transforming Growth Factor (TGF)- β , der Spannung des Gewebes und durch Ausschüttung von Fibronectin transformieren sie zu Myofibroblasten. Diese Myofibroblasten

sezernieren extrazelluläre Matrix- proteine (z. B. Fibronectin) und synthetisieren Elastin und Kollagene, wodurch eine provisorische neue Gewebsstruktur entsteht. Diese neue Struktur wird im Laufe der Reifungsphase (Nager 5-28 Tage post MI, große Säuger 14 Tage - 8 Wochen post MI) zu einem immer stabileren, aus Kollagenen und elastischen Fasern bestehendem Gewebe (Vanhoutte et al. 2006, Dobaczewski et al. 2010). Durch den Umbau des zuvor funktionstüchtigen Myokardmuskelgewebes in eine narbig-bindegewebige Struktur kommt es zu einem Verlust der Kontraktilität des gesamten linken Ventrikels, was sich in den linksventrikulären Funktionsparametern wie endsystolisches Volumen (ESV) und enddiastolisches Volumens (ESV) sowie den daraus berechneten Parametern Schlagvolumen (SV) und Auswurf fraktion (LVEF) niederschlägt. Durch diese Veränderungen kommt es nicht nur zu einer Dilatation des LV, es zeigt sich auch eine Veränderung der Gesamtform des Herzens in der MRT-Bildgebung. Das Herz wandelt sich nach und nach von einer ellipsoiden Form hin zu einer kugeligen Gestalt, was sich zusätzlich negativ auf die Funktionalität der Herzens auswirkt (Cohn et al. 2000).

Trotz Kenntnis dieser Vorgänge ist es weiterhin nicht oder nur unzureichend möglich, das individuelle Risiko für die Entwicklung eines chronischen Herzversagens nach MI vorherzusagen. In letzter Zeit rückt die Entzündungsreaktion nach akutem Myokardinfarkt (AMI) als sehr bedeutender Einflussfaktor des kardialen Remodelings in den Fokus der Forschung (Abbate und Dinarello 2014). Erwiesenermaßen wird nach einem AMI eine Entzündungsreaktion im Myokard initiiert, welche durch eine Akkumulation von Leukozyten im infarzierten Gewebe und durch die Produktion von Zytokinen und Chemokinen gekennzeichnet ist (Saxena et al. 2015).

1.3. Nucleotide-Binding and Oligomerization Domain-like Rezeptoren (NLRs)

Entzündungsreaktionen werden durch Zellen des Immunsystems initiiert, die eine Gefahrensituation wie beispielsweise eine Infektion oder traumatische Gewebeschäden erkennen. Zu dieser Erkennung trägt wesentlich die Interaktion zwischen Immunzellen und anderen Zellen des jeweiligen Gewebes bei. Im Falle des Herzens steht hier die Interaktion von Kardiomyozyten, Fibroblasten und

Endothelzellen mit Immunzellen im Vordergrund. Dabei spielen Proteine bei der Aktivierung und Regulation der interzellulären Verarbeitung von Information eine sehr unterschiedliche Rolle. Bisher sind noch lange nicht alle Aktivierungs- und Regulierungswege von Signalen innerhalb des Herzens bekannt.

Proteine und ihre Funktionen im kardialen Remodeling gelangen immer mehr in den Fokus der Wissenschaft. Dazu gehört auch die Gruppe der Nucleotide-Binding and Oligomerization Domain-like Receptors (NLRs). NLRs stellen die größte Gruppe der Pattern-Recognition Receptors (PRRs) dar (Tschopp et al. 2003). Sie initiieren in verschiedenen Geweben (v.a. im Zytosol) als Reaktion auf unterschiedliche Aktivatoren eine angeborene Immunantwort. Besonders durch ihre Rolle als intrazelluläre Rezeptoren für Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) und Danger-Associated Molecular Patterns (DAMPs) gewinnen sie immer mehr an Bedeutung (Damm et al. 2013). Durch ihre variable Amino-Terminal Effektordomäne, die entweder eine Caspase-activating and Recruitment Domain (CARD), eine Pyrin-Domain (PYD) oder eine Baculovirus inhibitory Repeat Domain (BIR) darstellt, werden NLRs in verschiedene Subgruppen unterteilt (Damm et al. 2013) (Abbildung 1). Auf die Effektordomäne folgt eine Nucleotide-binding Domain (NBD). Eine Serie von Carboxy-Terminal Leucine-rich Repeats (LRRs) dient zur Erkennung der Aktivatoren und ist wahrscheinlich auch an der Autoregulation der NLRs beteiligt.

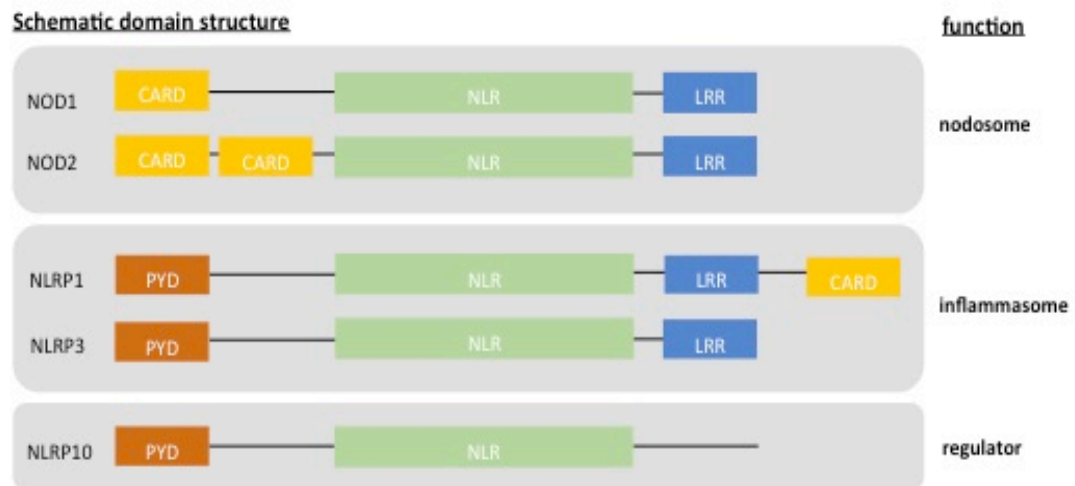


Abbildung 1: Schematische Darstellung der NLR Gruppe, PYD: Pyrin Domain, CARD: Caspase-Activating and Recruitment Domain, NLR: Nucleotide-binding and Oligomerization Domain, LRR: Leucine-Rich Repeats, modifiziert nach Damm et al. (2013) mit freundlicher Genehmigung des Verlags.

Durch Signalgebung der DAMPs und PAMPs lösen die NLRs eine intrazelluläre Signalkaskade aus, welche zur Formierung eines Proteinkomplexes, der als Inflammasom bezeichnet wird, führt (Kawaguchi et al. 2011). Durch diesen Proteinkomplex wird die Cystein-dependent-Aspartate-directed-Protease-1 (CASP1) aktiviert, die wiederum zur Bereitstellung der Entzündungszytokine (IL-1 β , IL-18) führt (Ogura et al. 2006). Das bis jetzt am besten charakterisierte NLR ist das Nod-like receptor protein 3 (NLRP3).

1.3.1. Nod-like Receptor Protein 3 (NLRP3)

Nod-like Receptor Protein 3 (NLRP3), auch bekannt als Cryopyrin, codiert ein Protein, das NLRP3 abhängige Inflammasom, welches die CASP1 Aktivität reguliert. Das NLRP3 Inflammasom, bestehend aus NLRP3, dem Adaptermolekül Apoptosis-associated Speck-like Protein containing a CARD (ASC) und der entzündungs-getriggerten CASP1 (Abbildung 2), kann sowohl durch endogene Alarmsignale, als auch durch Pathogene aktiviert werden (Ogura et al. 2006).

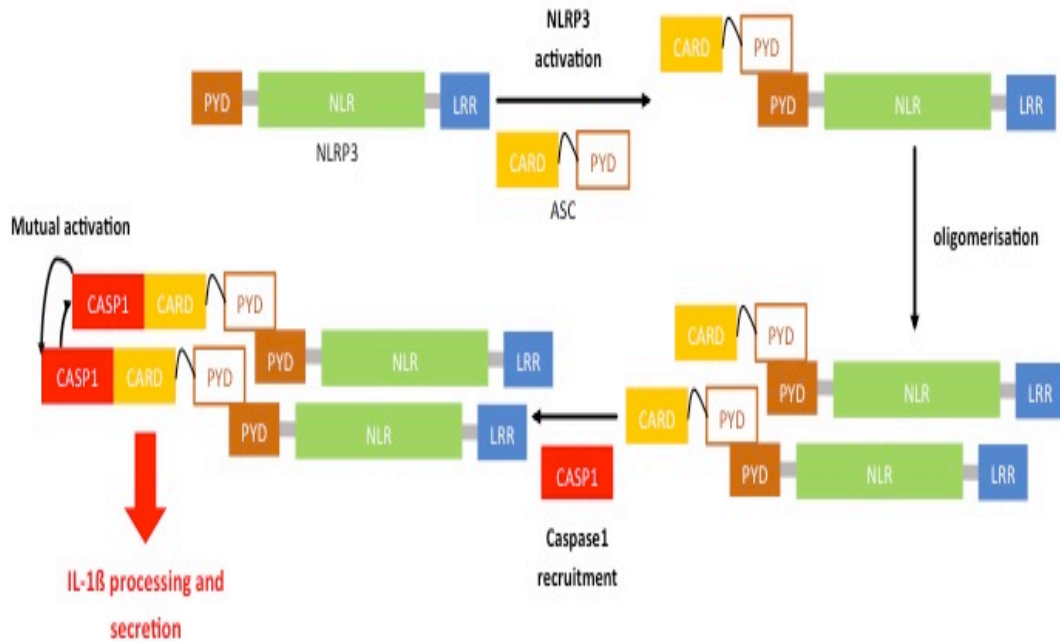


Abbildung 2: Zusammensetzung des NLRP3 Inflammasoms: CARD: Caspase Recruitment Domain, LRR: Leucine-Rich Repeat, NLR: Nucleotide Binding Domain, PYD: Pyrin Domain, CASP1: Cysteine-dependent-Aspartate-directed-Protease-1, modifiziert nach Abderrazak et al. (2015) mit freundlicher Genehmigung des Verlags.

S. Mariathasan et al. zeigten, dass NLRP3 mit dem Adaptermolekül ASC oligomerisiert. Dies geschieht beispielsweise durch Adenosintriphosphat (ATP), welches bei Gewebeschäden freigesetzt wird, oder auch durch Membranlipide. So wird das Enzym CASP1 (Abbildung 3) gebunden und schließlich IL-1 β freigesetzt (Mariathasan et al. 2006).

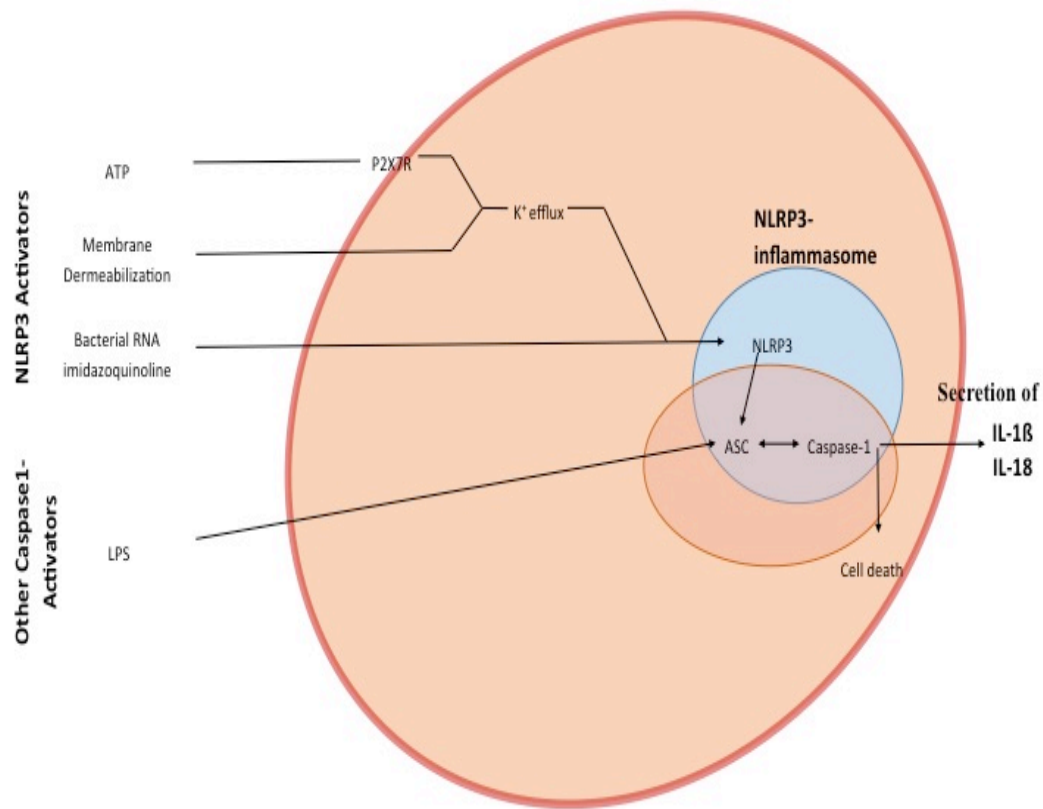


Abbildung 3: Wege der CASP1 Aktivierung: Pathogene und endogene Moleküle von geschädigten Zellen aktivieren durch das NLRP3 Inflammasom die Sekretion von IL-1 β , modifiziert nach Ogura et al. (2006) mit freundlicher Genehmigung des Verlags.

So konnte auch nachgewiesen werden, dass bei NLRP3 defizienten Mäusen die Sterblichkeit und die renale Dysfunktion in einem akuten renalen Tubulus-Nekrose Modell deutlich herabgesetzt war, bzw. sie vor renaler Dysfunktion geschützt waren (Shigeoka et al. 2010).

In den vergangenen Jahren wurden die Auswirkungen des NLRP3 Inflammasoms bei einem MI genauer erforscht. 2011 haben Kawaguchi et al. das erste Mal die Funktion des Inflammasoms bei einem MI untersucht. Sie beobachteten die Rolle des NLRP3 Inflammasoms bei ASC und CASP1-defizienten Mäusen mit einem AMI und wiesen erstmals die Aktivierung des Inflammasoms und die IL-1 β Produktion während eines MIs nach. Bei ASC-defizienten Mäusen konnten sie eine reduzierte Inflammation und kleinere Infarktgrößen im Vergleich zu den Kontrollgruppen aufzeigen. Durch Knochenmarks-Transplantations-Experimente konnte die Forschergruppe myokardiale Fibroblasten als zentrale Zellen für die Aktivität des Inflammasoms im Myokard ausfindig machen. Der genaue Mechanismus, wie der Inflammasom-Komplex die aktivierte CASP-1 von pro IL-

1 β in aktive IL-1 β spaltet, ist jedoch immer noch unentdeckt ist (Latz 2010). Die Eigenschaften des NLRP3-abhängigen Inflammasoms in einem MI Krankheitsmodell, bzw. einer Ischämie/Reperfusion (I/R) veröffentlichte die Gruppe um O. Sandanger 2013. Die Forscher konnten zeigen, dass in post MI Gewebe von Mäusen sowohl die Expression von NLRP3mRNA als auch von IL-1 β mRNA und IL-18mRNA in myokardialen Fibroblasten erhöht war.

In ihren in vitro Versuchen fanden Sandanger et al. heraus, dass von mit Lipopolysacchariden (LPS) vorbehandelten Fibroblasten, die nachträglich dem Alarmsignal ATP ausgesetzt waren, IL-1 β und IL-18 freigesetzt wurde. Vor allem aber konnte die Gruppe zeigen, dass das Fehlen von NLRP3 nachweislich die myokardiale Funktion verbessert und die Infarktgröße reduziert. Die Forscher konnten darstellen, dass das NLRP3 Inflammasom während eines MIs in myokardialen Fibroblasten aktiviert wird und dass diese Aktivierung mit den darauf folgenden Abläufen zu einer Gewebeschädigung im Myokard beiträgt. Die genauen Mechanismen, die zu dieser Aktivierung führen, sind bislang aber nicht bekannt (Sandanger et al. 2013).

Im Frühjahr 2015 wurde eine Studie über die antiinflammatorischen und antiarteriosklerotischen Effekte des NLRP3 Inflammasom Inhibitors Argabin veröffentlicht. In Apolipoprotein E-defizienten Mäusen (ApoE^{-/-}), die mit einer High-Fat Diät gefüttert wurden, konnte eine reduzierte Inflammation festgestellt werden. Es konnte außerdem eine deutliche Verringerung der arteriosklerotischen Plaques festgestellt werden (Abderrazak et al. 2015).

1.3.2. Nod-like Receptor Protein 10 (NLRP10)

Nod-like Receptor Protein 10 (NLRP10) gehört, genau wie NLRP3 zur Gruppe der NLRs. NLRP10, auch PYNOD genannt, unterscheidet sich jedoch von den anderen Proteinen der Familie der NLRs. Es besteht aus einer PYD und einer Nucleotide-oligomerisation Domain (NOD), im Gegensatz zu den anderen NLRs fehlt NLRP10 jedoch die LRR Domain. NLRP10 ist das erste Protein der NLRs, das in vitro eine anti-inflammatorische Aktivität zeigt (Zeng et al. 2012).

2004 untersuchte Wang et al. das Protein NLRP10 erstmals genauer. Wang et al. identifizierte NLRP10 in Humanen-, Maus- und Rattengenomen. Sie konnten eine hohe Konzentration der Messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) des Proteins im

Herzen, dem Gehirn und den Skelettmuskeln nachweisen. In allen anderen Geweben war die Konzentration vergleichsweise niedrig (Wang et al. 2004). In einer weiterführenden Studie beschäftigten sich Imamura et al. mit den molekularen Mechanismen der anti-inflammatorischen in vitro Aktivität von NLRP10 (Imamura et al. 2010). So konnten sie zeigen, dass humanes NLRP10 die Weiterleitung von CASP1 zu IL1 β hemmte und die Aggregation mit ASC, welche einen wesentlichen Bestandteil der Aktivierung von ASC darstellt, unterdrückt. Die Ergebnisse der in vitro Versuche mit Mausgenen zeigten, dass NLRP10 mit ASC kolokalisiert. Daher nahmen sie an, dass die CASP1 getriggerte IL1 β Freisetzung somit verhindert wird (Imamura et al. 2010). Zusätzlich konnte Imamura zeigen, dass transgene NLRP10 Mäuse gegen eine letale Dosis von LPS resistent waren und die transgene Expression von Maus-NLRP10 in Makrophagen die IL1 β Freisetzung, die durch eine mikrobielle Infektion induziert wurde, unterdrückt (Imamura et al. 2010). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde vermutet, dass NLRP10 als erstes Protein der Familie der NLRs eine negativ regulatorische Rolle in Bezug auf die in vivo Inflammation durch Hemmung der IL1 β -Freisetzung hat. Man erhofft sich endgültige Ergebnisse mit NLRP10 defizienten Knockout (NLRP10 $^{-/-}$ KO) Mäusen, die erst kürzlich generiert werden konnten, zu bekommen (Imamura et al. 2010).

Eisenbarth et al. (2012) veröffentlichten die Funktion und Bereitstellung des NLRP10 Proteins. Sie zeigten, dass bei NLRP10-defizienten Mäusen die angeborene Immunantwort beeinträchtigt war. Durch einen intrinsischen Defekt der Dendritischen Zellen (DC), durch die Abwesenheit von NLRP10, konnten diese nicht mehr aus dem entzündeten Gewebe auswandern, blieben gleichzeitig aber immer noch reaktionär mit Chemokinen (Eisenbarth et al. 2012). Rückschließend wurde vermutet, dass NLRP10 es den Dendritischen Zellen ermöglicht, entzündetes Gewebe zu verlassen, eine Immunantwort zu initiieren und somit als negativer Regulator bei einer Entzündung zu fungieren.

2015 fand die Gruppe um Eisenbarth jedoch heraus, dass der Defekt der Emigration der DCs nicht auf der Abwesenheit von NLRP10 beruhte, sondern auf eine Punktmutation des guanine nucleotide exchange factor (DOCK8) in der von ihnen verwendeten Mauslinie zurückzuführen war. DOCK8 reguliert die Zytoskelettbewegung in Leukozyten und kann so bei Abwesenheit zu einer eingeschränkten Immunantwort führen (Krishnaswamy et al. 2015).

Andere Studien beschäftigten sich mit der Rolle von NLRP10 in Bezug auf die angeborene Immunantwort bei bakteriellen Infektionen. Es scheint, dass NLRP10 bei einer Shigella-induzierten Entzündungsreaktion eine positive Immunantwort induziert (Lautz et al. 2012). Ebenso scheint NLRP10 eine protektive Rolle bei einer Candida albicans Infektion zu spielen, wobei auch bei diesen Modellen die Funktionsweise noch nicht geklärt ist (Joly et al. 2012).

2. Myokardiale molekulare Bildgebung in der Nuklearmedizin

Molekulare Bildgebungsmodalitäten, wie die Positronenmissionstomographie (PET) und die Magnetresonanztomographie (MRT) haben sowohl klinisch als auch präklinisch einen immer höheren Stellenwert (Sosnovik et al. 2007). Die Möglichkeit, spezifische Moleküle in bestimmten Geweben zu identifizieren und darstellen zu können, gibt Einblicke in die metabolischen Funktionswege und die Gewebszusammensetzung. Durch sehr gute Bildgebungsqualitäten ist es möglich, auch in den kleinsten anatomischen Geweben, z. B. einem Mäuseherz, eine ausreichende Bildqualität zu erlangen um eine gute räumliche Auflösung sowie eine genaue Beschreibung und Spezifität der dargestellten Organe/Gewebe zu erhalten (de Kemp et al. 2010). Aufgrund immer besserer Scanner-Hardware, verbesserter Bildrekonstruktionsalgorithmen und neuen Tracern, die spezifische Moleküle ansteuern, ist zusätzlich eine zunehmende Sensitivität der Verfahren bei steigender Spezifität hinsichtlich des untersuchten Targets gegeben (Rowland und Cherry 2008, de Kemp et al. 2010).

Die Diagnose eines MI kann durch die Magnetresonanztomographie (MRT) und die Positronenmissionstomographie (PET) sichergestellt werden. Aufgrund eines hervorragenden Weichteilkontrasts bei gleichzeitig exzellenter Darstellung der kardialen Funktionen hat sich das MRT als Goldstandard bei vielen Fragestellungen durchgesetzt. Zudem können mit diesen Methoden können die bereits bestehenden Veränderungen in der Geometrie des linken Ventrikels sehr exakt eingeschätzt, die linksventrikuläre Funktion gemessen und Umbauvorgänge auf molekularer Ebene untersucht werden (Rischpler et al. 2013).

2.1. Einsatz der Magnetresonanztomographie (MRT) nach einem MI zur Messung des endsystolischen Volumens (ESV) und des enddiastolischen Volumens (EDV) und der Auswurfraction (LVEF)

Speziell für die Darstellung der ablaufenden Vorgänge nach einem MI und des linksventrikulären Remodelings ist die MR-Bildgebung in den letzten Jahren zum Gold-Standard in der Humanmedizin geworden (Kramer et al. 2010). Durch eine hohe räumliche Auflösung und Sensitivität ist es möglich, die Herzfunktion sowohl regional als auch global darzustellen. Spezielle Spulen und genau ausgerichtete Protokolle ermöglichen ein exaktes Bild der Herzfunktion, vor allem durch die Bestimmung der endsystolischen und enddiastolischen Volumina nach einem MI und der daraus berechneten linksventrikulären Auswurfraction (LVEF) (Hiller et al. 2008). Die LVEF ist ein Parameter für die Auswurfleistung des Herzens. Je höher dieser Wert ist, desto besser ist die Pumpfunktion des linken Ventrikels. Das EDV ist definiert als das Blutvolumen, welches am Ende der Diastole - hier sind beide Herzkammern erschlafft - gemessen wird. Das ESV wiederum ist das Blutvolumen, welches nach der Systole im Ventrikel verbleibt. Die LVEF berechnet sich aus dem endsystolische Volumen (ESV) und dem enddiastolische Volumen (EDV), welche durch die MR Bildgebung bestimmt werden können. Nach einem MI dilatiert das Herz und es entsteht nach und nach ein erhöhtes ESV und EDV. Nach einem Infarkt bzw. im Verlauf eines zunehmenden Remodelings kommt es somit zu einem Abfall der LVEF (Ross et al. 2002).

Genau wie in der Humanmedizin ist es möglich, präklinisch die MRT zur Bestimmung dieser Parameter im Mausmodell nach einem MI zu verwenden. Gerade für Verlaufsstudien wird die MRT häufig sowohl in der Humanmedizin als auch in der präklinischen Forschung an verschiedenen Krankheitsmodellen (z.B. Maus) verwendet (Winter et al. 2008).

Durch den Einsatz von Kontrastmitteln (KM) ist es in der MRT möglich, funktionelle, metabolische und morphologische Informationen zu erfassen. Speziell in der kardio-vaskulären Diagnostik besteht die Möglichkeit, mit Hilfe von KM kardiale Abläufe wie Perfusion, Kontraktilität oder Myokardschädigung darzustellen (J. Bogaert 2006). Für die Darstellung der genannten Abläufe werden sowohl in der Humanmedizin als auch in der präklinischen Forschung

extrazelluläre KM, die auf dem Metall Gadolinium basieren und die vor allem für die Darstellung der Narbendartstellung nach einem MI von Bedeutung sind, verwendet. Durch ihre verlängerte Auswaschkinetik ist es möglich, myokardiales Narbengewebe exakt darzustellen (Protti et al. 2010).

Durch eine Gradient Echo Pulse (CINE) Sequenz der MRT Messung kann eine Messung zur Berechnung der linksventrikulären Funktionsparameter durchgeführt werden. Das Herz wird von der Basis bis zur Spitze gescannt, wobei die MRT-Daten- Akquisition in viele Schnittbilder und Herzphasen aufgeteilt wird und somit eine CINE Sequenz entsteht. Diese gibt die geometrischen und funktionellen Parameter, wie die LVEF, das EDV und das ESV des Herzens wieder. Typischerweise werden die CINE Bilder in Kurz- und Langachsenschnitte geplant, um eine exakte Darstellung der Herzfunktion zu bekommen. Durch etablierte Softwareprogramme ist es anhand dieser CINE Sequenzen möglich, die kardialen Funktionsparameter zu berechnen. Diese Methode ist im klinischen Alltag Routine und erlangt auch in der präklinischen Forschung immer mehr Bedeutung (Schneider 2011).

2.2. Einsatz der Positronenemissionstomographie (PET) nach einem MI zur Messung der Infarktgröße (%LV)

Die Positronenemissionstomographie (PET) ermöglicht, Targets (wie z.B. Rezeptoren, Stoffwechselwege oder Moleküle) durch radioaktive Stoffe, sogenannte Tracer, zu visualisieren. Die molekulare Bildgebung PET arbeitet, nicht wie die MRT mit KM, sondern mit radioaktiven Tracern. Ein Tracer ist ein Radiopharmakon, bei dem die radioaktive Substanz an einen Botenstoff gekoppelt wird und es dadurch möglich ist, einen Einblick in die physiologischen oder pathologischen Stoffwechselvorgänge zu bekommen (Mohnike et al. 2006). So wird der Transport, die Aufnahme im Zielorgan und alle weiteren Stoffwechselprozesse des Tracers visualisiert (Kuwert et al. 2007).

Die Erfassung der Infarktgröße (%LV) durch die PET ist sowohl in der Humanmedizin als auch in der präklinischen Forschung Goldstandard (Redfors et al. 2012).

Die PET Scanner in der präklinischen Forschung basieren auf dem gleichen Prinzip wie in der Humanmedizin. Um den Patienten bzw. das Tier sind

ringförmig Gammadetektoren angeordnet. Das Prinzip der PET wird durch das Zerfallen der oben genannten radioaktiven Stoffe (Nuklide) unter Abgabe von Positronen gekennzeichnet. Wenn ein Nuklid ein Positron freisetzt und es im Körper des Patienten bzw. des Tieres auf ein Elektron trifft, resultiert daraus die Emission zweier Photonen, die sich um 180° voneinander wegbewegen (Prinzip der Annihilation). Durch das gleichzeitige Auftreffen dieser Photonen auf zwei gegenüberliegenden Detektoren (Koinzidenz) ist es möglich, diese zu detektieren und zu orten. Somit kann eine gerade Linie, genannt line of response (LOR), durch den Körper gelegt werden. Dadurch wird die genaue Verteilung im Körper und die Anzahl der Koinzidenzen auf der jeweiligen LOR registriert (Turkington 2001, Kuwert et al. 2007). Da die Photonen nicht zwangsläufig vom gegenüberliegenden Detektor erfasst werden, sondern vom Gewebe auf dem Weg zum Detektor abgefangen werden, gibt es eine sogenannte Schwächungskorrektur (Attenuation Correction) (Turkington 2001, Kapoor et al. 2004). Durch die Registrierung einer sehr großen Anzahl von Koinzidenzen, hervorgerufen durch die Gabe eines Radionuklids, ist letztendlich die Rekonstruktion zu einem dreidimensionalen Bild mit entsprechenden Bildverarbeitungssystemen möglich (Turkington 2001). Die Höhe des Tracer Uptakes kann durch solche Programme semiquantitativ bzw. quantitativ mittels sogenannter Regions of Interest (ROI) quantifiziert werden (Kuwert et al. 2007). Ein Organ, hier das Herz, kann somit funktionell untersucht werden.

Die verwendeten Tracer in der PET basieren auf radioaktiven Elementen wie Iod, Fluor, Sauerstoff oder Kohlenstoff, welche an Substrate gekoppelt werden. ^{18}F Fluorodesoxyglucose, $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ ist der in der Nuklearmedizin am häufigsten eingesetzte PET-Tracer. Sowohl in der klinischen Routine als auch in der präklinischen Forschung wird $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ u.a. für die Vitalitätsdiagnostik des Herzens genutzt (Rowland und Cherry 2008). ^{18}F Fluor, mit einer Halbwertszeit (HWZ) von 110 Minuten, wird an die Trägersubstanz Desoxyglukose gekoppelt. Der Tracer $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ wird i.v. appliziert. Das $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ wird über einen insulinabhängigen passiven Transport über die Glukosetransporter in die Kardiomyozyten aufgenommen. In den Zellen wird das $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ durch die Hexokinase phosphoryliert, es entsteht 18Desoxy-Glukose-6-Phosphat. Dieses wird wegen der fehlenden OH-Gruppe nicht mehr weiter verwertet. Eine Anreicherung des gekoppelten Radionuklids ist die Folge. Die anfallende

Gamma-Strahlung wird durch die Detektoren des PET gemessen. Somit kann die [^{18}F]FDG-Verteilung im Körper und im speziellen im Herzen bildlich dargestellt werden (Mohnike et al. 2006). Eine maximale Anreicherung ist im Schnitt 60 bis 90 Minuten nach i.v. Gabe erreicht (Kapoor et al. 2004). Ein Teil des ungebundenen [^{18}F]FDG wird über die Niere ausgeschieden.

Durch einen Myokardinfarkt entsteht im Myokard eine Narbe die kein [^{18}F]FDG mehr aufnehmen kann. Vitales und narbiges Myokard können somit unterschieden werden und dadurch letztendlich die Größe des Infarktes mit Hilfe von Softwareprogrammen berechnet werden (Schober und Heindel 2007, Kramer et al. 2010, Brunner et al. 2012).

Die PET Bildgebung überzeugt durch ihre hohe Sensitivität bei allen molekularen und metabolischen Prozessen (Rahmim und Zaidi 2008). Da die räumliche Auflösung bei klinischen Geräten begrenzt ist, wird durch den Einsatz von speziellen Kleintier-PET Geräten eine ausreichende räumliche Auflösung für die Beurteilung kleinster Organe/Gewebe gewährleistet. Diese Scanner verfügen über eine sehr gute Bildqualität und eine hohe quantitative Aussagekraft, die es ermöglicht, auch in Geweben wie z. B. dem Mäuseherz auswertbare Bilder zu erhalten (de Kemp et al. 2010, Dobaczewski et al. 2010).

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Versuchsaufbau

Insgesamt wurden vier Gruppen (NLRP10^{-/-} n=16 und SHAM NLRP10^{-/-} n=6; WT n=14 und SHAM WT n=14) verglichen (Abbildung 4). Sowohl bei der Versuchsgruppe NLRP10^{-/-} als auch der Kontrollgruppe der WT Mäuse wurde eine permanente LAD-Ligation durchgeführt. Die beiden anderen Gruppen (SHAM NLRP10^{-/-} - und SHAM WT) wurden scheinoperiert (SHAM).

NLRP 10 ^{-/-} LAD Ligation	
MRT und PET Bildgebung	Gruppengröße
Tag 5, 21 und 90	16
WT LAD Ligation	
MRT und PET Bildgebung	Gruppengröße
Tag 5, 21 und 90	14
NLRP10 ^{-/-} SHAM OP	
MRT und PET Bildgebung	Gruppengröße
Tag 5, 21 und 90	6
WT SHAM OP	
MRT und PET Bildgebung	Gruppengröße
Tag 5, 21 und 90	14

Abbildung 4: Übersicht über die verschiedenen Gruppengrößen und Zeitpunkte der MRT und PET Bildgebung, die bei allen Gruppen durchgeführt wurden.

Postoperativ (post OP) folgten PET und MRT Bildgebungen von allen Mäusen an Tag 5, 21 und 90 (Abbildung 5). Am Ende des Versuches (Tag 90) wurden alle Mäuse in tiefer Allgemeinanästhesie tierschutzgerecht mit einer Überdosis Pentobarbital (Narcoren®, Merial GmbH) intraperitoneal (i.p.) euthanasiert. Das Körpergewicht (KGW) wurde von allen Mäusen notiert (ABT 220-5DM, Fa. Kern) und mit Hilfe einer Schublehre (Schublehre, Fa. DIAL 15) die Tibialänge (TL) am rechten Hinterbein gemessen, ohne dabei den Knochen heraus-

zupräparieren. Durch eine Thorakotomie konnte das Herz unterhalb der Vorhöfe aus dem Thorax entnommen werden und vorsichtig mit einer NaCl-Lösung (Isotonische Kochsalzlösung 0,9%, Fresenius Kabi GmbH, Deutschland) durchspült werden, um möglicherweise entstandene Blutkoagel zu entfernen. Nach Durchspülen des Herzens wurde das Herzgewicht (HW) jeder Maus notiert. Anhand einer Schwanzbiopsie, die zusätzlich von jeder Maus nach Versuchsende genommen wurde, konnte durch PD Dr. O. Groß aus der Klinischen Chemie des Klinikums Rechts der Isar eine Regentypisierung durchgeführt werden und der zuvor ermittelte Genotyp jeder Maus nochmals bestätigt werden.

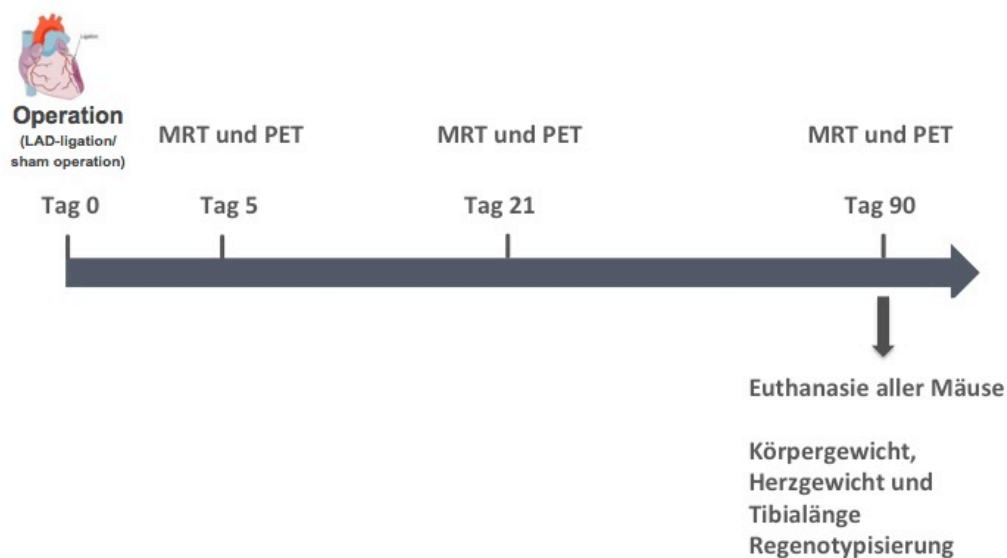


Abbildung 5: Timeline des Versuchablaufes.

2. Versuchstiere

Diese Studie wurde unter dem Aktenzeichen 55.2-1-54-2532-153-14 von der Regierung von Oberbayern genehmigt.

Es wurden insgesamt 50 männliche ausgewachsene Mäuse im Alter von 8-12 Wochen verwendet.

2.1. Mauslinie NLRP10^{fl/fl}

Die Versuchsgruppe mit dem veränderten NLRP10-Genlocus (NLRP10^{fl/fl}) ermöglicht sowohl eine gewebsspezifische als auch eine globale Gendelektion von

NLRP10.

Die Abschlussbeurteilung der NLRP10 Zuchtlinie zeigte, dass diese Tiere keine Belastungen durch die genetische Veränderung erfahren. Die Linie wird seit vier Jahren in der Forschungsgruppe von PD Dr. Olaf Groß sowie in der Haltung des Erzeugerlabors, dem Institut für Biochemie der Universität Lausanne, zur Organentnahme gezüchtet. Es wurden bisher an keinem der beiden Standorte Anzeichen einer Belastung festgestellt (PD Dr. Olaf Groß, Abschlussbeurteilung NLRP10-/-).

Die Tiere, die für diese Doktorarbeit verwendet wurden, wurden in der Tierhaltung des Zentrums für präklinische Forschung am Klinikum Rechts der Isar gezüchtet.

2.2. Kontrollgruppe

Aufgrund des genetisch veränderten Hintergrunds der Versuchsgruppe wurden Wildtyp (WT) Mäuse, also wurffinterne, nicht genetisch veränderte Kontrollen (Littermate) verwendet. Somit konnte gleiches Alter, einen gleichen genetische Hintergrund sowie eine gleiche Darmflora sichergestellt werden.

3. Versuchstierhaltung

Die Haltung der Tiere im Klinikaustauschraum in der Nuklearmedizinischen Klinik des Klinikums Rechts der Isar erfolgte unter SPF-Bedingungen in speziellen einzelbelüfteten Käfigen zur Haltung von Mäusen (Tecniplast-IVC). Je nach Gewicht wurden die Mäuse in kleinen Gruppen in Mäusekäfigen (Typ- I Superlong; Grundfläche 16 x 37 cm) gehalten. Futter (autoklaviertes Alleinfuttermittel für Mäuse, Fa. Altromin) und Wasser (angesäuertes Trinkwasser bei zweimaligem Flaschenwechsel pro Woche) erhielten die Tiere ad libitum. Spezielles Holzgranulat diente als Einstreu, bei 0,5 – 2 Wechsel pro Woche. Nestbaumaterial wurde als autoklavierter Zellstoff zur Verfügung gestellt, ebenso ein Maushaus (roter Kunststoff). Die Räume waren speziell als spezifische-pathogenfreie-Räume (SPF) konzipiert. Das bedeutet: personenlimitierte Zutrittskontrolle, Pflege durch ausgebildete Versuchstierpfleger,

Klimatisierung, Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 Stunden mit Dämmerungsphase (Vgl. Richtlinien des Zentrums für präklinische Forschung des Klinikums Rechts der Isar).

Die Haltung der Tiere erfolgte in Umsetzung der in der EU-Richtlinie 63/2010 festgelegten Bedingungen.

4. Operativ induzierter Myokardinfarkt

Der operativ induzierte Myokardinfarkt entstand durch das Ligieren des im veterinärmedizinisch benannten Ramus interventricularis paraconalis. Im lateinischen wird die Arterie Ramus interventricularis anterior (RIVA) genannt und im englischen Left anterior descending artery (LAD) (Abbildung 6). Im Folgenden wird der englische Begriff (LAD) verwendet.

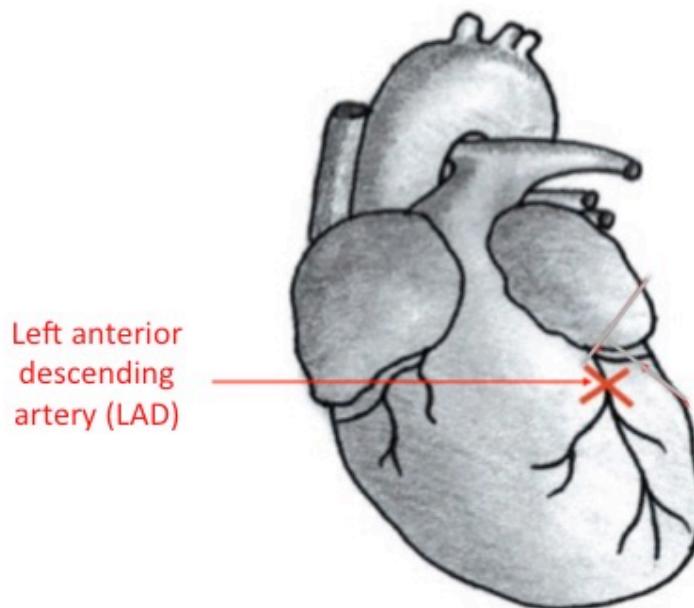


Abbildung 6: Darstellung des Mäuseherzens. Das rote Kreuz kennzeichnet die Stelle der Ligatur der left anterior descending artery (LAD) für einen 30-40%-igen MI (Tarnavski et al. 2004).

4.1. Anästhesie und Intubation

Die Narkose wurde mit einer voll antagonistisierbaren Injektionsnarkose aus Medetomidin-Midazolam-Fentanyl (MMF) eingeleitet und aufrecht erhalten. Die Kombination eines alpha-2-Agonisten (Medetomidin 0,5 mg/kg, Domitor®, Pfizer, Karlsruhe), einem Benzodiazepin (Midazolam 5 mg/kg, Dormicur®,

Hoffman-La Roche, Wyhlen) und einem Opioid (Fentanyl 0,05 mg/kg, Fentanyl-Janssen®, JanssenCilag GmbH, Neuss) wurde intraperitoneal verabreicht.

Auf die Augen der Mäuse wurde eine Bepanthen-Augensalbe (Bayer Vital GmbH, Leverkusen) aufgetragen, um sie vor Austrocknung zu schützen.

Nach Erreichen des chirurgischen Toleranzstadiums, getestet anhand des Zwischenzehenreflexes, wurden die Tiere intubiert und für die Dauer der Operation mit Hilfe eines Beatmungsgerätes (Mini Vent, Type 845, Hans Sachs Elektronik, Deutschland) kontrolliert beatmet.

Hierfür wurde die Maus auf dem Rücken gelagert und an den Vorderzähnen mit Hilfe eines Gummis fixiert. Für die gesamte Dauer der Operation lag die Maus auf einer Wärmematte (16 Watt Wärmematte, TRIXXI, Germany), um die Körpertemperatur konstant zu halten.

Als Tubus diente eine 22 Gauge Venenverweilkanüle (Braun, Vasofix® Safety 22G). Die Intubation wurde mit einem speziell für Nager entwickelten Laryngoskop (Penn Century, Blade Assembly, Small Animal Laryngoscope Model LS-BA-M for mouse, USA) durchgeführt (Abbildung 7). Nachdem die korrekte Lage des Tubus festgestellt worden ist - was bedeutete, dass die beiden Lungenflügel sich synchron zur Beatmungsfrequenz bewegten - wurde die Maus an den Gliedmaßen mit Klebeband (Durapore, 3M Deutschland GmbH) auf dem OP-Tisch fixiert. Die Maus wurde während der gesamten Operationsdauer mit einem Atemzugvolumen von 200µl und einer Atemfrequenz von 150/min beatmet.

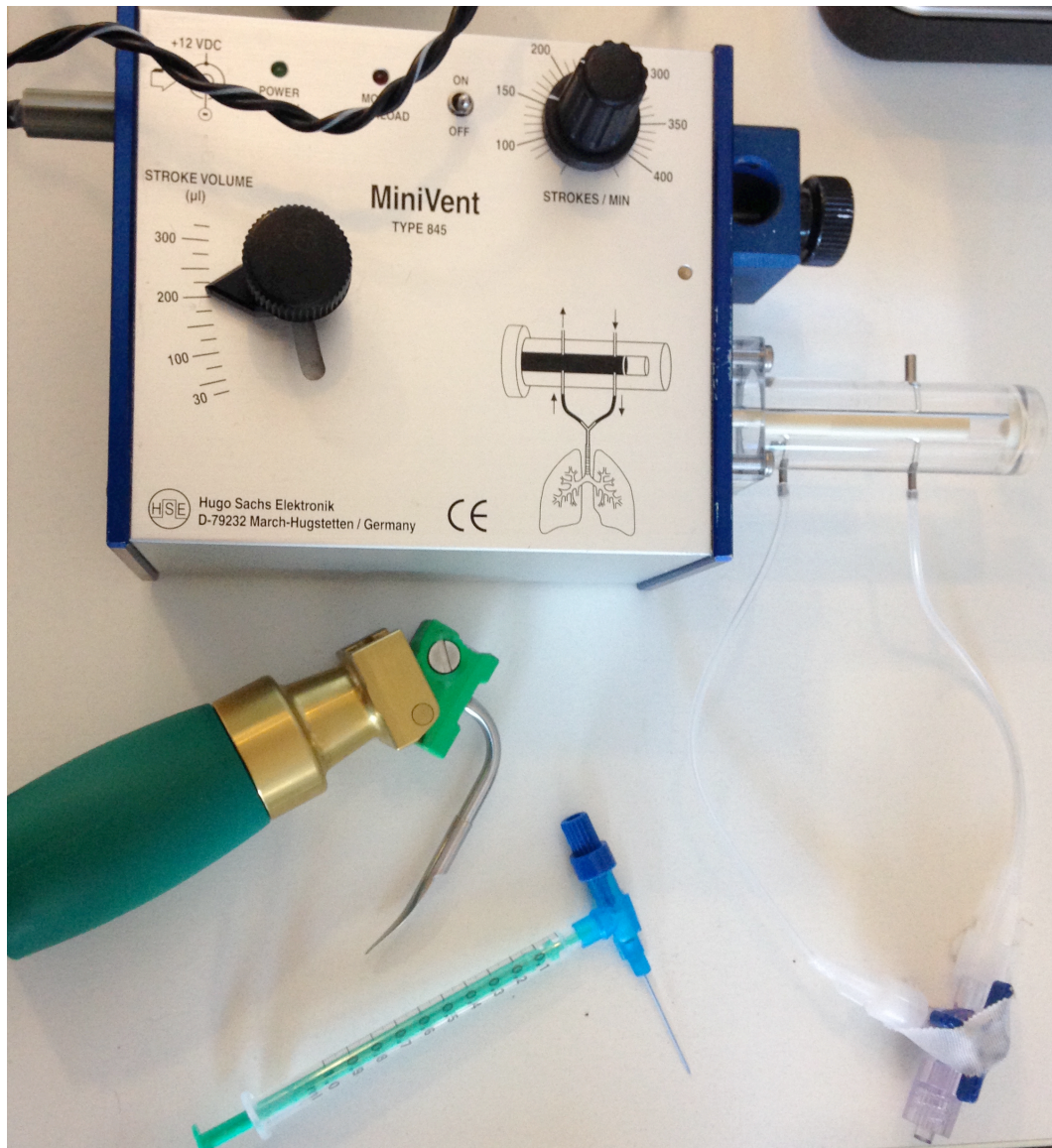


Abbildung 7: Verwendete Materialien zur Intubation, 22 Gauge Venenverweilkanüle (Braun, Vasofix® Safety 22G), Nager Laryngoskop (Penn Century, Blade Assembly, Small Animal Laryngoscope Model LS-BA-M for mouse, USA), Beatmungsgerät (Mini Vent, Type 845, Hans Sachs Elektronik, Deutschland).

4.2. Myokardinfarkt

Die linke Thoraxwand wurde enthaart (Enthaarungscreme, Fa. Veet) und desinfiziert. Der Thorax wurde mit einem Hautschnitt von ca. 0,8cm im 3. Interkostalraum (ICR) eröffnet (Abbildung 8).

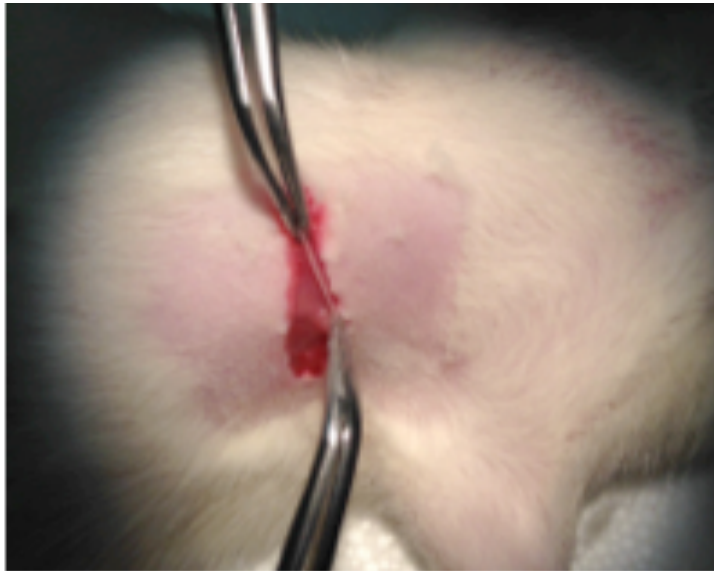


Abbildung 8: Desinfizierte und enthaarte Thoraxwand mit einem ca. 0,8cm langen Hautschnitt.

Die Haut wurde von der Faszie abgelöst und die Mm. Pectorales durchtrennt. Die 3. und 4. Rippe wurden mit Hilfe eines Rippenspreizers (Rippenspreizer 1-0, Roboz) gespreizt. Das Perikard wurde dargestellt und ebenfalls eröffnet (Abbildung 9).



Abbildung 9: Eröffnen des Thorax und Eröffnen des Perikards.

Die LAD-Arterie wurde distal des Abgangs des Ramus circumflexus durch eine Ligatur (Prolene, 8-0, Ethicon) verschlossen (Abbildung 10).

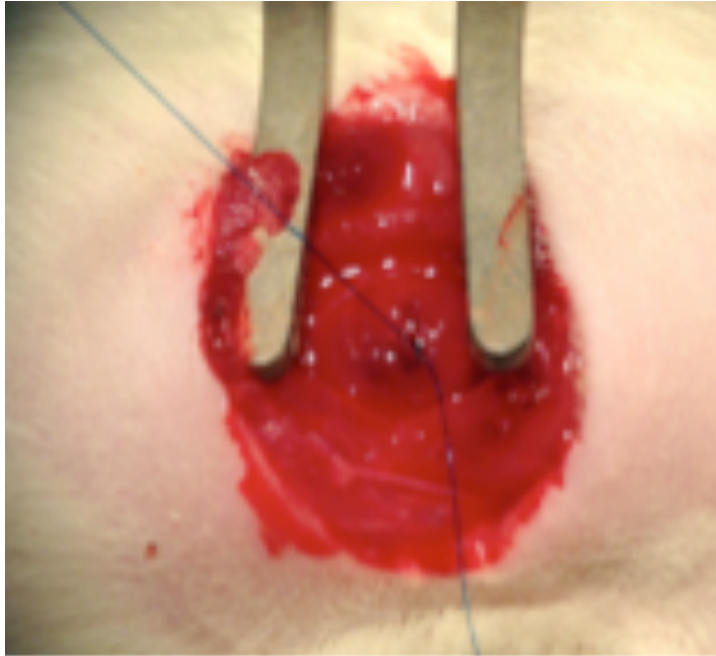


Abbildung 10: Ligation der LAD-Arterie.

Die Gruppe von Mäusen, die scheinoperiert wurden (SHAM-Gruppe), erhielt an dieser Stelle keine Ligatur. Somit wurden die Mäuse sowohl intubiert als auch narkotisiert und erhielten eine Thoraxeröffnung sowie eine Eröffnung des Perikards. Lediglich die LAD-Ligation wurde ausgelassen, wodurch kein Infarkt gesetzt wurde. Trotzdem wurden die Mäuse einer Narkose und einer Thoraxeröffnung unterzogen.

Anschließend wurde der Thorax in 3 Schichten (Verschluss des 3. ICR, Verschluss der Muskelnahrt (Mm. Pectorales), Hautnaht) wieder verschlossen (Ethibond Excel, 5-0, Ethicon) (Abbildung 11). Die gesamte OP wurde unter einem Mikroskop (Mikroskop Axiovert 200, Carl Zeiss, Jena) durchgeführt. Folgende Instrumente wurden verwendet: Nadelhalter, chirurgische Pinzette, mikrochirurgische Schere (alles Firma Roboz) und eine Mikropräparierschere (FST Heidelberg).



Abbildung 11: Verschluss des Thorax.

Die Narkose wurde mit Hilfe des $\alpha 2$ -Rezeptorantagonisten Atipamezol 5 mg/kg (Antisedan[®], Pfizer, Karlsruhe) und des Benzodiazepin-Antagonisten Flumazenil 1 mg/kg (Anexate[®], Pfizer, Karlsruhe) antagonisiert. Auf Naloxon, den Antagonisten des Opioids, wurde verzichtet, da die postoperative Analgesie mit dem Opioid Buprenorphin durchgeführt wurde. Sobald die Maus Abwehrzeichen mit den Vorderläufen zeigte, konnte sie extubiert werden.

Um das Tier während der postoperativen Phase bestmöglich mit Analgetika zu versorgen, wurde ein Score-Protokoll geführt, welches die Tiere engmaschig überwachte (Abbildung 12).

Die Tiere wurden nach der OP zurück in ihre Käfige in Gruppenhaltung gesetzt. Sie erhielten sofort Wasser ad libitum und nach 4-6 Stunden wieder Zugang zu Futter.

Alle Operationen wurden von der gleichen Person (Anna Bartels) durchgeführt. Sowohl WT als auch NLRP10^{-/-} Mäuse wurden im Rahmen einer Blindstudie der LAD Ligation mit gleicher Operationstechnik unterzogen. Die Operateurin wusste also nicht, ob es sich bei der zu operierenden Maus um einen WT oder eine NLRP10^{-/-} Maus handelt. Beide Genotypen befanden sich zusammen in Käfigen und es waren äußerlich keine Unterscheidungsmerkmale zu erkennen.

4.3. Postoperative Behandlung/ Schmerztherapie

20 Minuten vor Gabe der Antagonisten wurde den Mäusen subkutan Buprenorphin (Temgesic[®], Essex Pharma, München) 0,05mg/kg verabreicht. Somit begann die postoperative Behandlung rechtzeitig vor dem Erwachen des Tieres. Weiterführend wurde für die folgenden 72 Stunden, Carprofen (Rimadyl[®], Pfitzer GmbH, Berlin) 4mg/kg s.c. alle 12 Stunden und Buprenorphin (Temgesic[®], Essex Pharma, München) 0,05mg/kg s.c. alle 8 Stunden verabreicht.

5. In vivo Bildgebung

Alle Mäuse wurden an Tag 5, 21, 90 post OP sowohl im MRT als auch im PET gescannt. Die MRT Bildgebung fand jeweils vormittags statt, die PET Bildgebung nachmittags.

5.1. Magnetresonanztomographie (MRT) der NLRP10 Mausgruppe und der WT Kontrollgruppe zur Messung der Auswurfraction (LVEF) und des endsystolischen Volumens (ESV) und des enddiastolischen Volumens (EDV)

Für die in vivo Messungen der Herzfunktion wurden alle Mäuse an Tag 5, 21 und 90 post OP an einem 7 Tesla GE/Agilent MR901, Fa. GE Magnetresonanztomographen gescannt. Dabei wurde ein MR-Volumenresonator-Insert (Y-YOS-HQS-070-01450 V01, RAPID Biomedical GmbH) und eine flexible Empfangsarray-Spule (P-H02LE-070-01507-001 V01, RAPID Biomedical GmbH) verwendet (Abbildung 13).

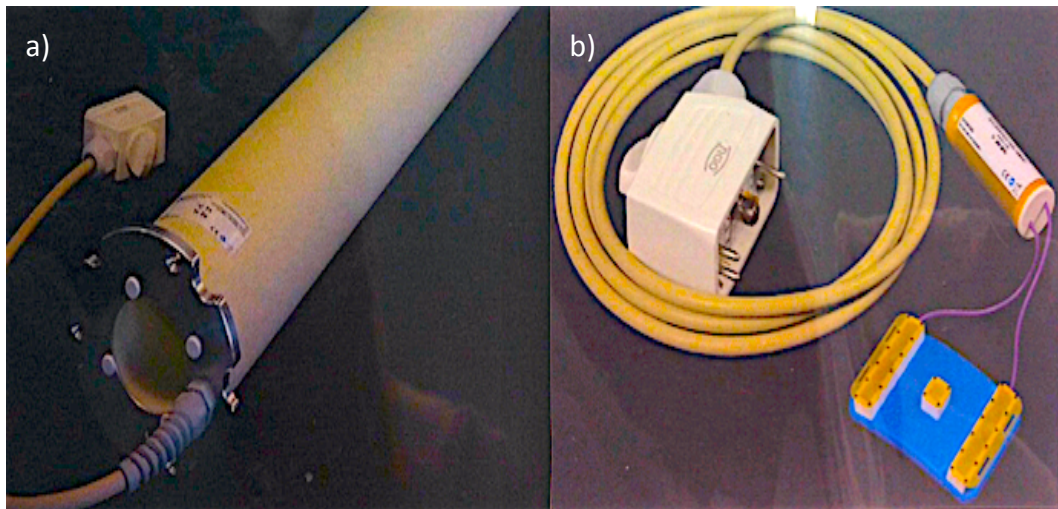


Abbildung 13: MR-Volumenresonator-Insert (a) und die flexible Empfangsarray-Spule (b).

Die Narkose wurde in einer Narkosebox (Induction chamber for mice and rats, Rothacher Medical GmbH, Heitenried) mit 5% Isofluran (Isofluran CP, CP Pharma Burgdorf; Forane®/Forene®, Vapor 19.3, Germany) und 1-2 Liter Sauerstoff/min eingeleitet (Abbildung 14).

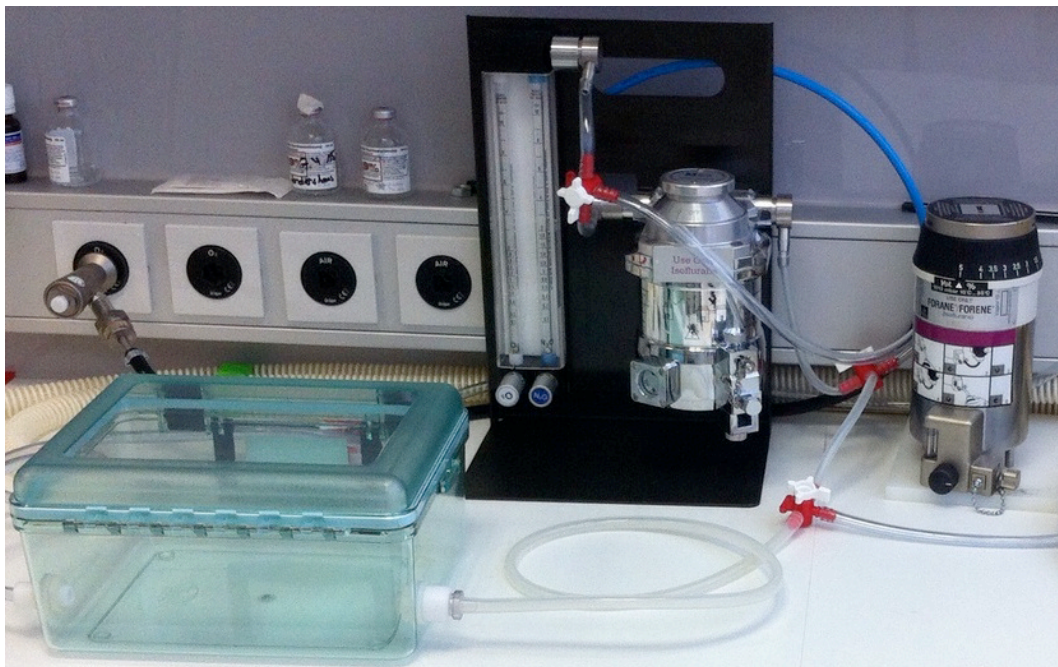


Abbildung 14: Narkosebox und Isoflurangerät.

Die Narkose wurde während der Bildgebung mit einer MRT-kompatiblen Anästhesieeinheit, (DRE Veterinary, Kentucky, USA) mit 1,5-2% Isofluran und

gleichbleibendem Sauerstoff aufrechterhalten. Zum Schutz der Hornhaut wurde eine Bepanthen Augensalbe (Bayer Vital GmbH, Leverkusen) aufgetragen. Für die Zeit des Kontrastmittelspritzens lag die Maus auf einer Wärmematte (Bosotherm 1200, Boso+Sohn GmbH&Co KG). Es wurde ein Schwanzvenenkatheter (30 G Hypodermic needle, BBraun, Fine Bore Polyethylene Tubing, 28mm, Smith Medical Australasia PTY. Ltd.) in die Schwanzvene der Maus gelegt (Abbildung 15) und das Kontrastmittel Gadopentetate dimeglumine (Gd-DTPA) (0,5mmol/ml Magnograf, Jenapharm GmbH&CO KG, Jena) injiziert. Die zu injizierende Dosis, 0.6mmol/kg Körpergewicht (KGW) bei einer Konzentration von 0,5mmol/ml Gd-DTPA, wurde auf eine 25g Maus berechnet und ergab 0,015mmol/25g Maus. Somit errechnete sich eine zu injizierende Menge von 30µl Gd-DTPA mit Natriumchlorid (NaCl) (Isotonische Kochsalzlösung 0,9%, Fresenius Kabi GmbH, Deutschland) auf 100µl verdünnte Lösung.



Abbildung 15: Schwanzvenenkatheter und Anästhesieschlauch.

Die Maus wurde im Scanner platziert und dort mit einer EKG Apparatur (ECG Trigger Unit, RAPID Biomedical GmbH), die an den Vorderläufen mit Ultraschallgel (ULTRASCHALLGEL Dispenser, C+V Pharma Depot GmbH) zur Signalverstärkung angebracht wurde, ausgestattet. Ebenfalls wurde die Maus mit einer Atemfrequenz-Triggerung (ECG Trigger Unit, RAPID Biomedical GmbH)

und einer Rektalsonde (RAPID Biomedical GmbH) zur Überwachung der Körpertemperatur, ausgestattet. Durch eine im MRT eingebaute Wärmepumpe (Air Heating Control Unit, RAPID Biomedical GmbH) wurde das Auskühlen der Mäuse während der Messung verhindert (Abbildung 16).

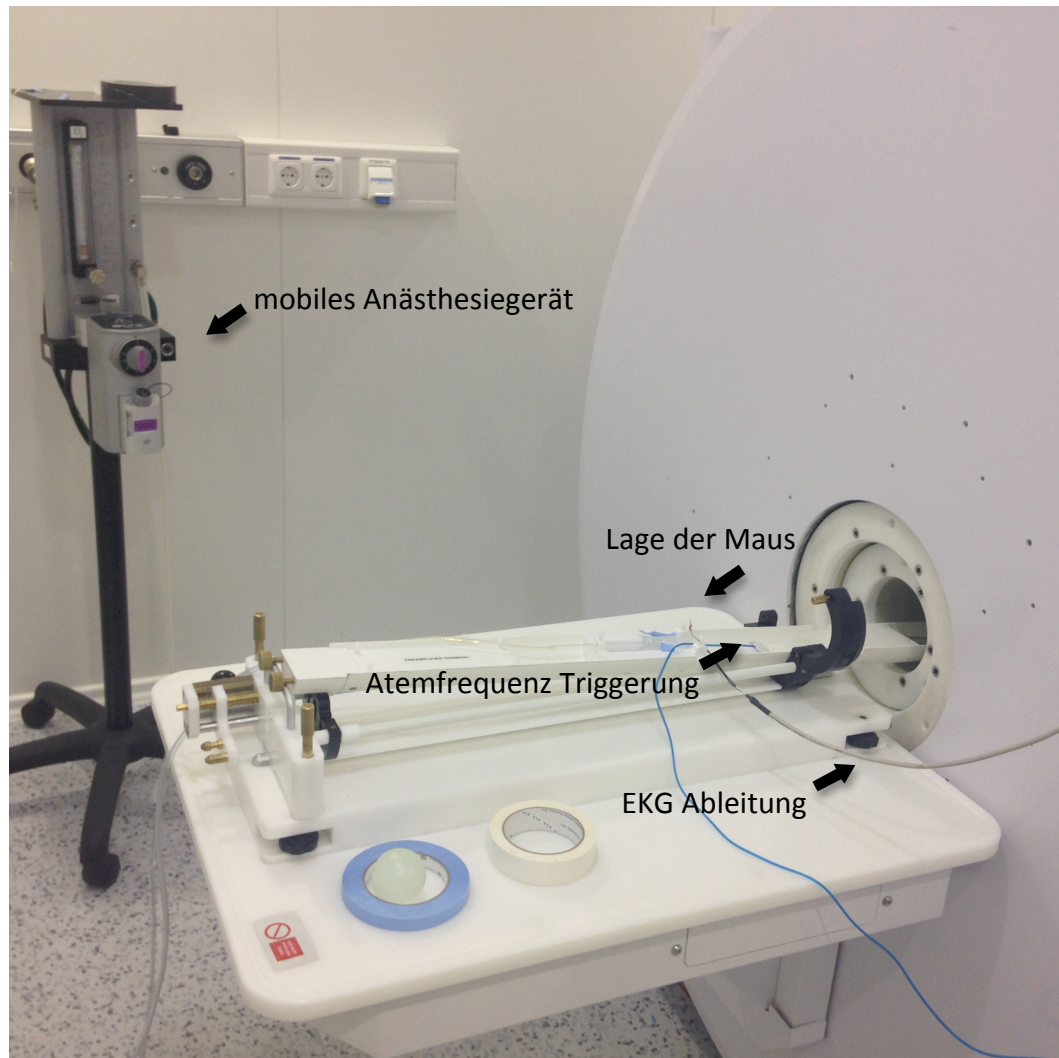


Abbildung 16: Setup der MRT Bildgebung mit mobilem Anästhesiegerät, Atemfrequenz Triggerung, EKG Ableitung und der Lage der Maus.

Mit der EKG Ableitung war es möglich, die Triggerung der MRT-Pulse zu beeinflussen und somit Bewegungsartefakte zu vermeiden. Des Weiteren konnte damit das Herz in verschiedenen Phasen des Herzzykluses dargestellt werden.

Nach den Planungssequenzen (Localizer) und den Zwei- und Vier- Kammerblick-Sequenzen (Abbildung 17), wurden durch den gesamten linken Ventrikel in einer Gradient Echo Pulse Sequenz (CINE-Sequenz) Kurzachsenschnitte gelegt und gescannt.

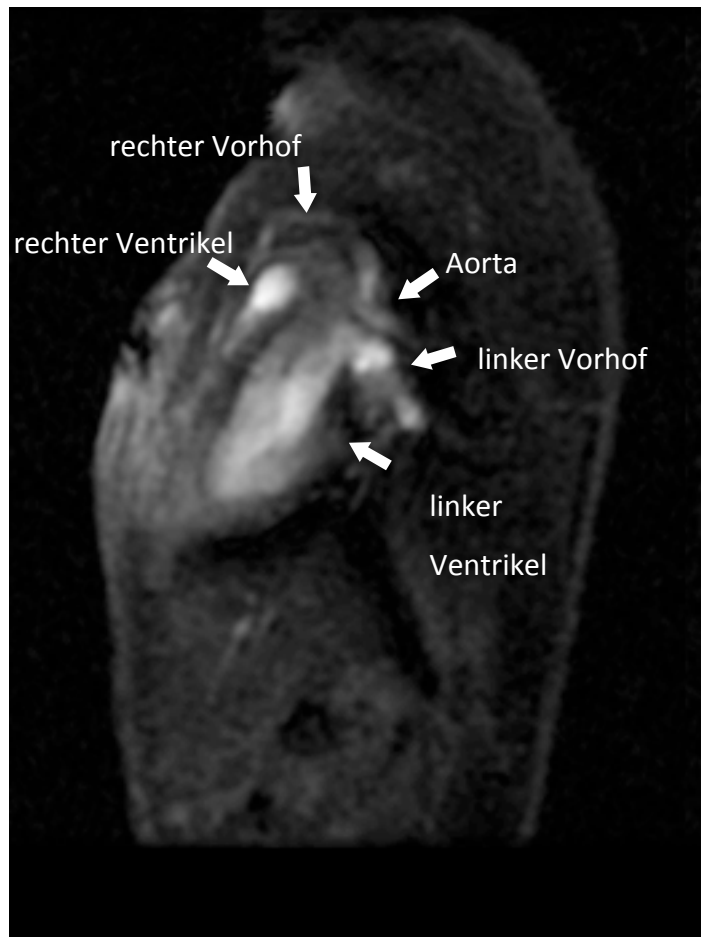


Abbildung 17: MRT 4-Kammerblick im Rahmen der Planungssequenzen.

Die CINE Sequenz wurde mit folgenden Parametern geplant: Echo time, 2,6ms, 16 frames per RR interval (TR 4,3-6,9ms); resolution $256 \times 256 \times 1000 \mu\text{m}^3$; NEX 2; flip angle 60° . Die CINE Sequenz konnte zur Berechnung der LVEF und des enddiastolischen Volumens (EDV) und des endsystolischen Volumens (ESV) verwendet werden.

5.2. Auswertung des enddiastolischen Volumens (EDV) des endsystolischen Volumens (ESV) und der Auswurfraction (LVEF), mittels MRT der NLRP10 Mausgruppe und der WT Kontrollgruppe

In dieser Arbeit wurde die linksventrikuläre Auswurfraction (LVEF), das enddiastolische Volumen (EDV) und das endsystolische Volumen (ESV) anhand der MRT Messungen, genauer der CINE Sequenzen, zwischen NLRP10^{-/-} KO und den WT Mäusen berechnet und verglichen. Die Auswertung der MRT Bilder

mit dem Programm Munich Heart/MRI[®] liefert das EDV und das ESV und die aus beiden Parametern errechnete LVEF.

Die quantitative Analyse der CINE Sequenzen der MRT wurde mit einer halbautomatischen Methodik mit Hilfe des Programms Munich Heart/MRI[®] der Technischen Universität München berechnet. Durch die CINE Sequenz, die mehrere Herzzyklen aufzeichnet, war es möglich die einzelnen Aktionsphasen des Herzens zu bestimmen. Entsprechend dazu konnten die Volumina in der Endsystole und der Enddiastole des linken Ventrikels genau berechnet werden. Die epi- und endokardialen Konturen der gesamten Schichten des linken Ventrikels wurden dabei per Hand nachgezeichnet (Abbildung 18) (Brunner et al. 2012). Durch die Nachzeichnung der epi- und endokardialen Konturen für die Bestimmung der ESV und der EDV berechnete das Programm Munich Heart/MRI[®] dann die LVEF nach der Formel $LVEF = (EDV - ESV)/EDV \times 100$.

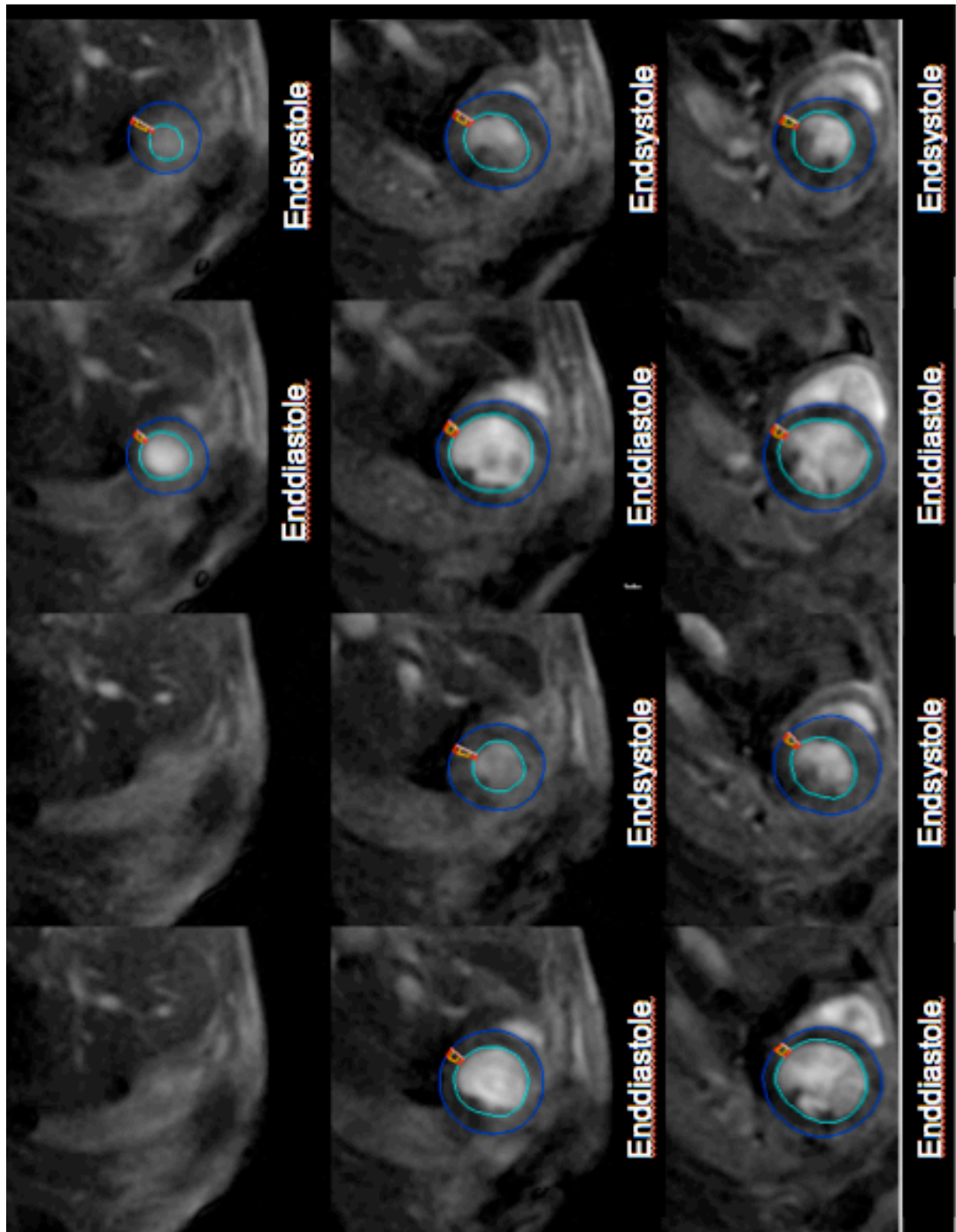


Abbildung 18: Berechnung der LVEF durch die Darstellung der epi – und endokardialen Konturen in allen Schichten des linken Ventrikels anhand des Programms Munich Heart.

5.3. Positronenemissionstomographie (PET) der NLRP10 Mausgruppe und der WT Kontrollgruppe zur Messung der Infarktgröße (%LV)

Alle Mäuse wurden an einem Inveon microPET small animal scanner, Fa. Siemens HealthcareMolecular Imaging, gescannt (Abbildung 19).

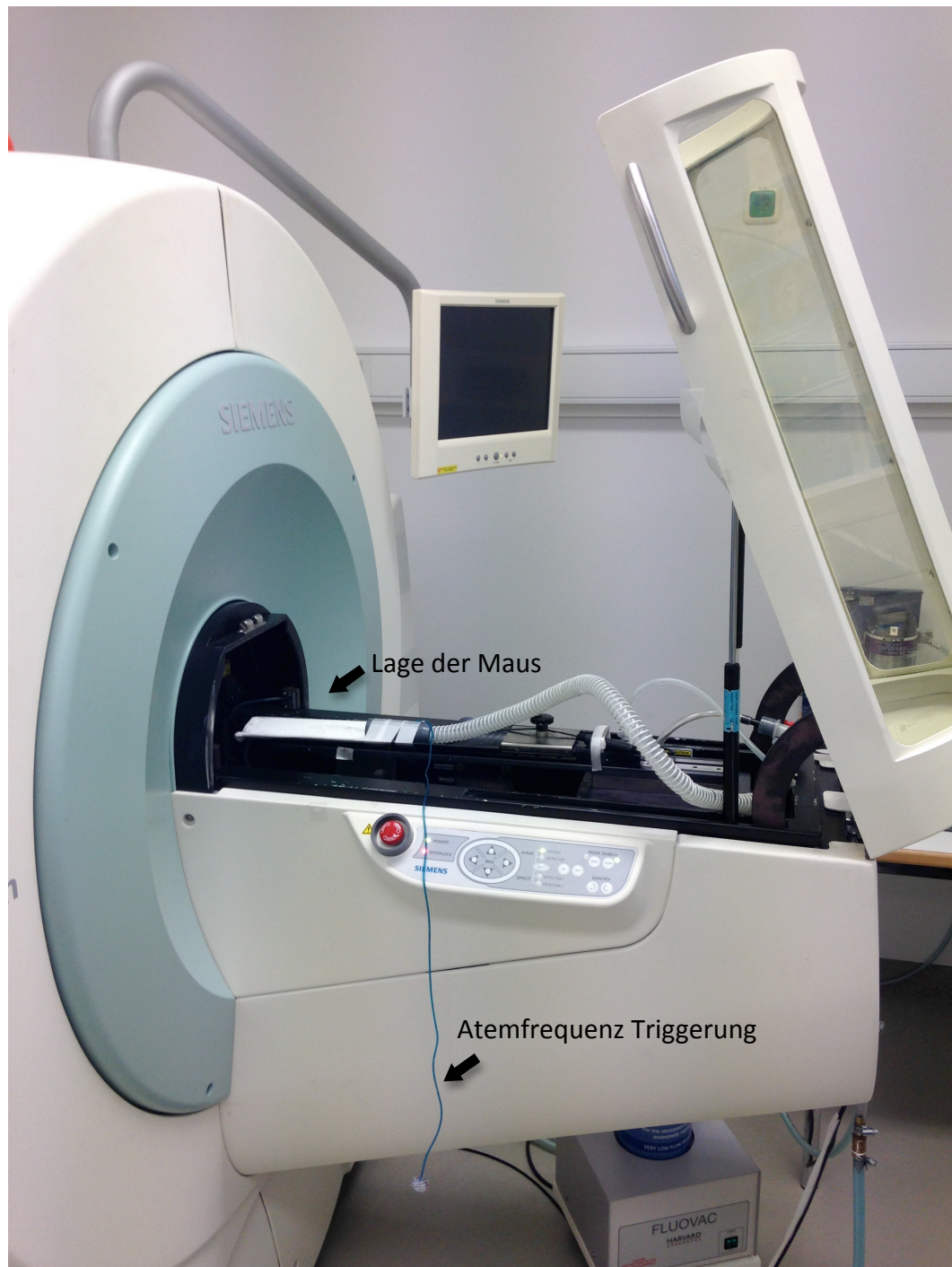


Abbildung 19: Setup der PET Bildgebung mit Lage der Maus und der Atemfrequenz Triggerung.

Die PET Messungen fanden an Tag 5, Tag 21 und Tag 90 post OP statt. Um den Uptake des Tracers ^{18}F -FDG in Kardiomyozyten zu standardisieren und dadurch eine bessere Darstellung des Infarktareals zu erhalten, wurden alle Mäuse vier Stunden vor dem Start der Bildgebung gefastet (Thackeray et al. 2014). Die Einleitung und die Erhaltung der Narkose erfolgte, wie bei der MRT Bildgebung

auch, in einer dafür vorgesehenen Narkosebox (Induction chamber for mice and rats, Rothacher Medical GmbH, Heitenried) mit 5% Isofluran (Isofluran CP, CP Pharma Burgdorf; Forane[®]/Forene[®], Vapor 19.3, Germany) und 1 Liter Sauerstoff/min. Auch wurde, genau wie bei der MR Bildgebung, ein Schwanzvenenkatheter (30 G Hypodermic needle, BBraun, Fine Bore Polyethylene Tubing, 0m28mm, Smith Medical Australasia PTY. Ltd.) gelegt und kurz mit einer 0,9% NaCl Lösung (Isotonische Kochsalzlösung 0,9%, Fresenius Kabi GmbH, Deutschland) durchgespült. Über die Schwanzvene wurden zu jedem Bildgebungstermin $12 \pm 0.9 \text{ MBq}$ des Tracers ^{18}F -FDG injiziert. Der Tracer wurde im hauseigenen Zyklotron der Nuklearmedizin des Klinikums Rechts der Isar synthetisiert.

60 Minuten nach intravenöser (i.v.) Injektion wurden die Mäuse in ventraler Lage im Scanner positioniert, sie lagen während der gesamten Wartezeit in Narkose. Um sicherzustellen, dass die Mäuse während der Messung nicht auskühlen, lagen sie auf einer Wärmematte (Bosotherm 1200, Boso+Sohn GmbH&Co KG). Zusätzlich wurde während der Messung die Atmung mit Hilfe eines Atemsensors (Andermatt BioVet, Schweiz) überwacht. Auf eine EKG-Überwachung wurde bei dieser Studie verzichtet, da bei der PET-Messung lediglich die Infarktgröße (%LV) quantifiziert werden sollte und nicht die Funktionsparameter des linken Ventrikels (LVEF), welche im MRT bestimmt wurden. Es folgte die statische Akquirierung der PET Daten über 15 Minuten. Die Bilder wurden in zwei Schritten mit einer MAP 3D (mit 32 Iterationen Bildrekonstruktionsalgorithmen) und einer OSEM 3D (4 Iterationen) in einer 128×128 Matrix rekonstruiert. Die Voxelgröße beträgt $0,9 \times 0,9 \times 0,8 \text{ mm}^3$ (Brunner et al. 2012).

Nach der Messung wurden die Mäuse zurück in ihre Käfige gelegt und hinter eine dafür vorgesehene Barytbetonwand im Klinikaustauschraum der Nuklearmedizinischen Klinik gebracht, um die Strahlung, die durch die Tracergabe vorhanden war, abzuschirmen bis die Radioaktivität abgeklungen war.

5.4. Auswertung der Infarktgröße (%LV) mittels PET der NLRP10 Mausgruppe und der WT Kontrollgruppe

Die Infarktgröße wurde als x-Prozent des untergegangenen Gewebes des linken Ventrikels durch die akquirierten PET Daten dargestellt. Die gesamte 15-minütige

Aufzeichnungsdauer der PET wurde als statisches Bild rekonstruiert und mit dem Programm Munich Heart/NM[®] der Technischen Universität München berechnet (Abbildung 20). Nach ‚händischer‘ Definition der langen Achse wurden automatisch die langen und kurzen Achsen sowie die Polarmap rekonstruiert. Der Infarktbereich wurde mit einem Threshold (Schwellenwert) von 60% der Aktivität von [¹⁸F]FDG im Herzen dargestellt. Daraus ergab sich der Anteil des linken Ventrikels, der von einem MI betroffen ist (Brunner et al. 2012). Diese Berechnungen wurden zu jedem Bildgebungstermin bei allen Mäusen (NLRP10-/- und WT) durchgeführt (Abbildung 21).

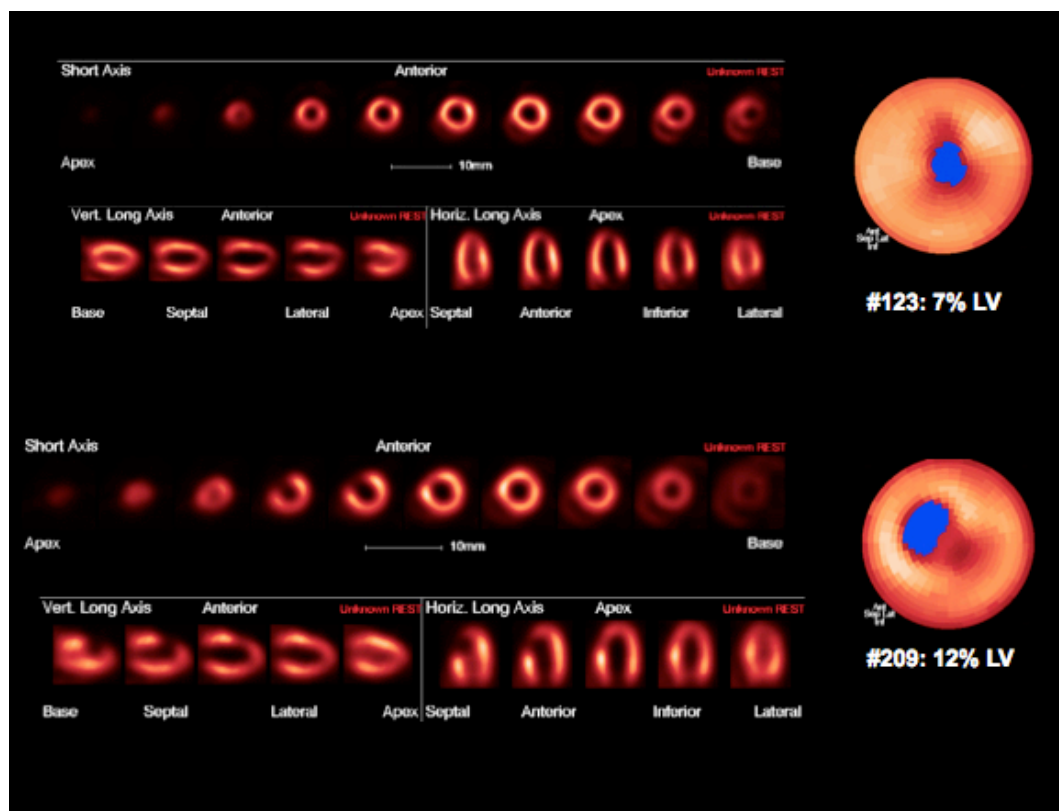


Abbildung 20: Beispiel der Infarktgrößenbestimmung der PET Bildgebung mit dem Programm Munich Heart/NM[®]; es sind 2 Mausmessungen dargestellt.

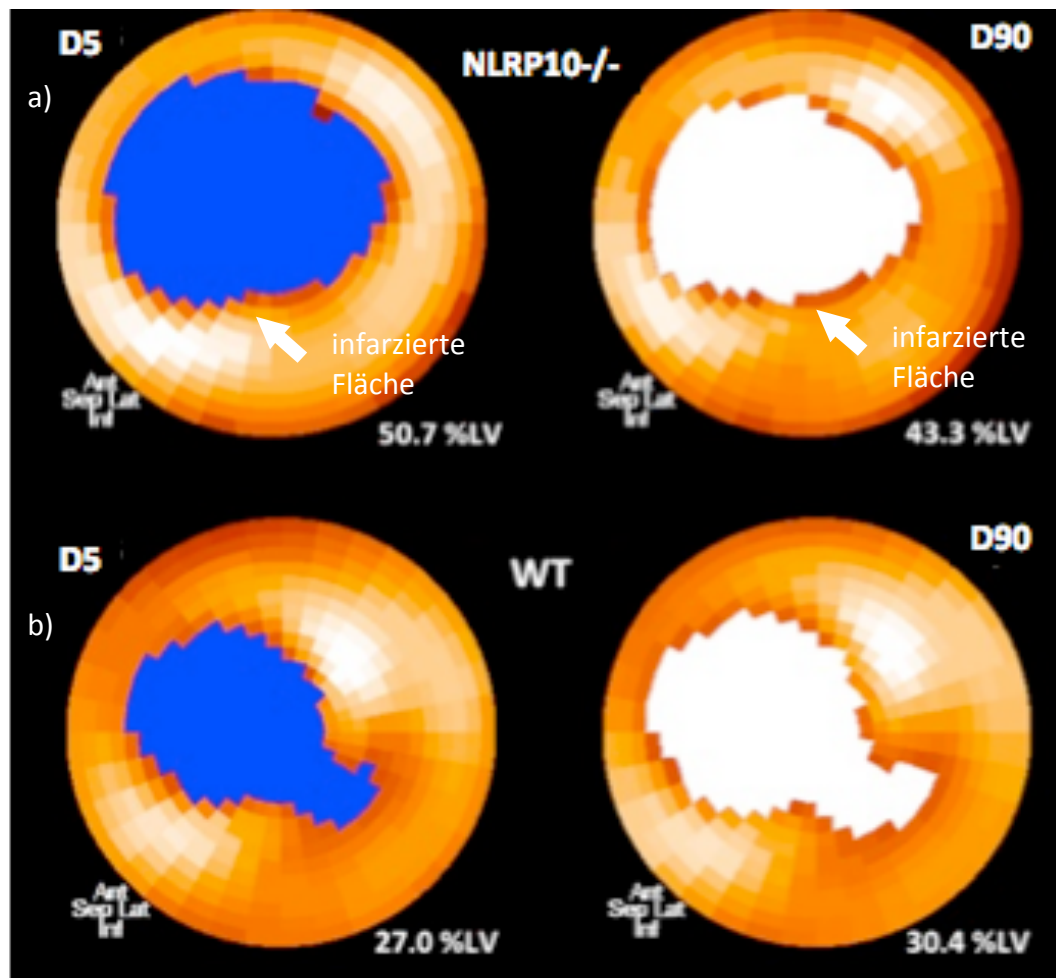


Abbildung 21: Alternative Darstellung der berechneten infarzierten Fläche der PET Messungen, im Vergleich an Tag 5 und Tag 90 bei NLRP10^{-/-} (a) und WT (b).

6. Korrelation der Infarktgröße (%LV) der PET und der Histologie durch histologische Aufarbeitung des Mäuseherzens

In Zusammenarbeit mit der Pathologie des Klinikums Rechts der Isar wurde von sechs Mäusen aus der Kontrollgruppe eine aufwendige histologische Infarktgrößenbestimmung durchgeführt. Dadurch war die Korrelation der Infarktgröße der PET und Histologie möglich. Nach Entnahme und Durchspülung der Herzen wie in Kapitel 1 Versuchsaufbau beschrieben, wurden die drei Mäuseherzen in 10% neutral-gepuffertem Formalin (Sigma-Aldrich) fixiert. Nach 12 Stunden wurden die Herzen in einer aufsteigenden Alkohol-/Xylolreihe entwässert und paraffiniert. Die Einbettung in Paraffinblöcke erfolgte in senkrechter Orientierung, mit der Herzbasis nach unten. Im Anschluss wurden die Herzen

histologisch aufgearbeitet, wobei im Wechsel jeweils $20 \times 2 \mu\text{m}$ dicke konsekutive Schnitte mit einem Kryotom (ThermoScientific, CM 350E) (Abbildung 22) auf Superfrost Plus Objektträger (Firma Süssfrost) aufgezogen und $100 \mu\text{m}$ des Blocks verworfen werden. Der jeweils erste Schnitt wurde mittels Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt.

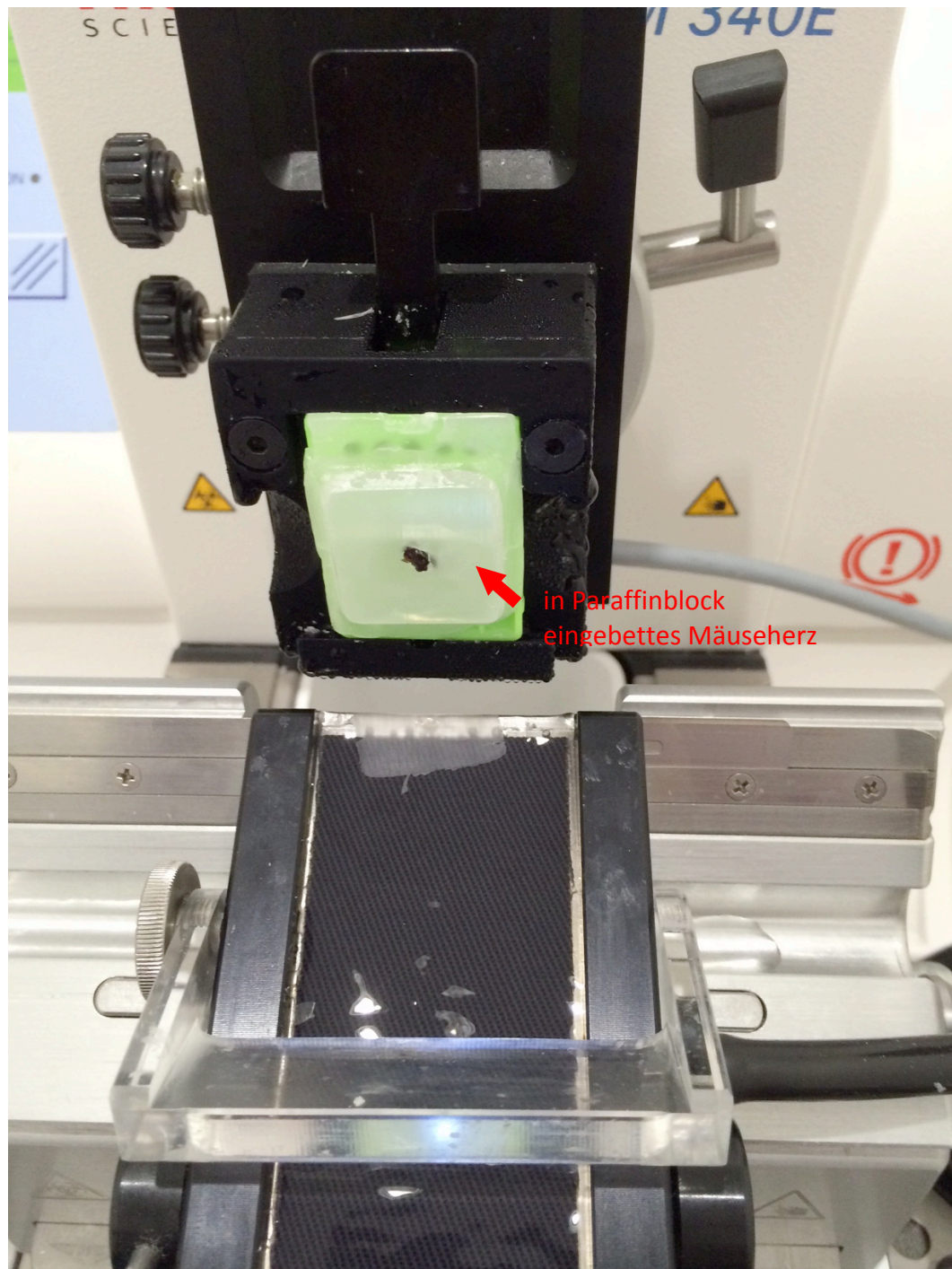


Abbildung 22: Schnittbeispiel eines Herzen im Paraffinblock.

Die HE gefärbten Schnitte wurden mit einem Aperio CS2 eingescannt und elektronisch mit Imagescope ausgewertet. Die Beurteilung des Infarktareals erfolgte in Zusammenarbeit mit einem erfahrenen Tierpathologen. Es wurde in allen Schnittebenen die angeschnittene Fläche der linken Ventrikelwand und die Infarktfläche markiert (Abbildung 23 und Abbildung 24). Die mittels Imagescope ermittelten Flächen wurden in Excel (2011) transferiert, um dann die Infarktgröße in Prozent berechnen zu können.

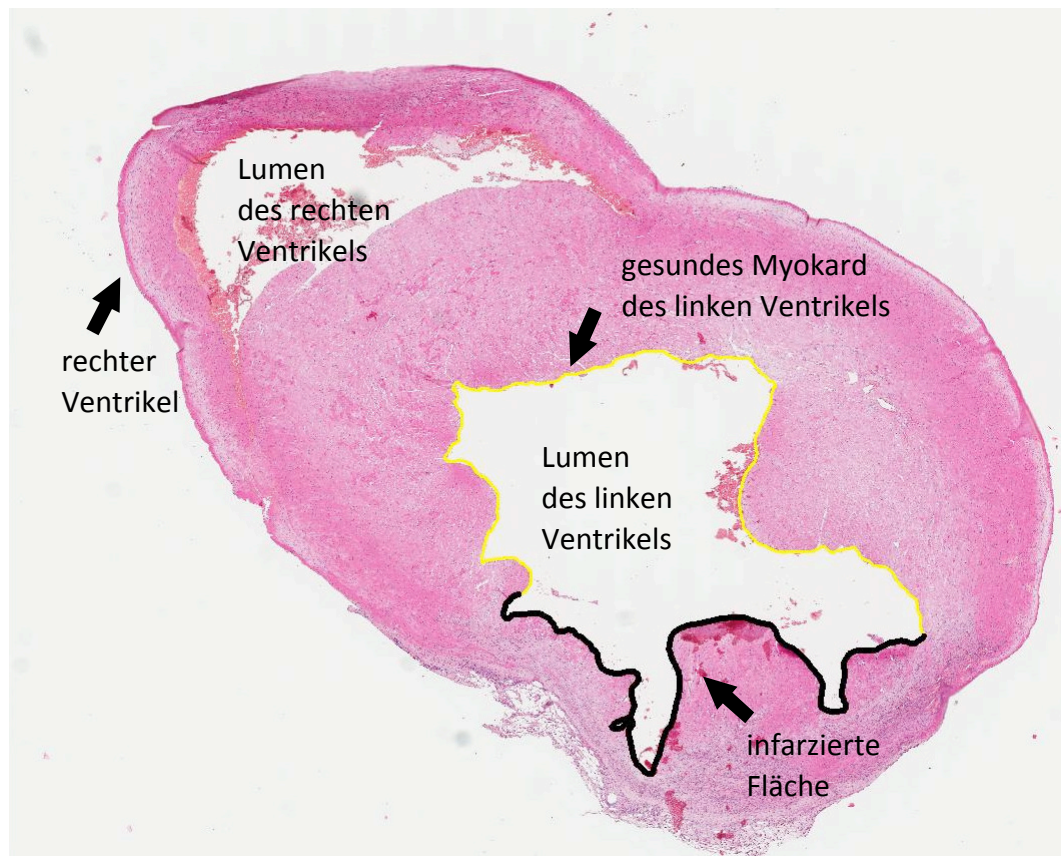


Abbildung 23: Axiale Schnittebene des linken Ventrikels; die gelbe Linie zeigt die Konturen des gesunden Myokards, die schwarze Linie stellt den infarzierten Bereich des linken Ventrikles dar.

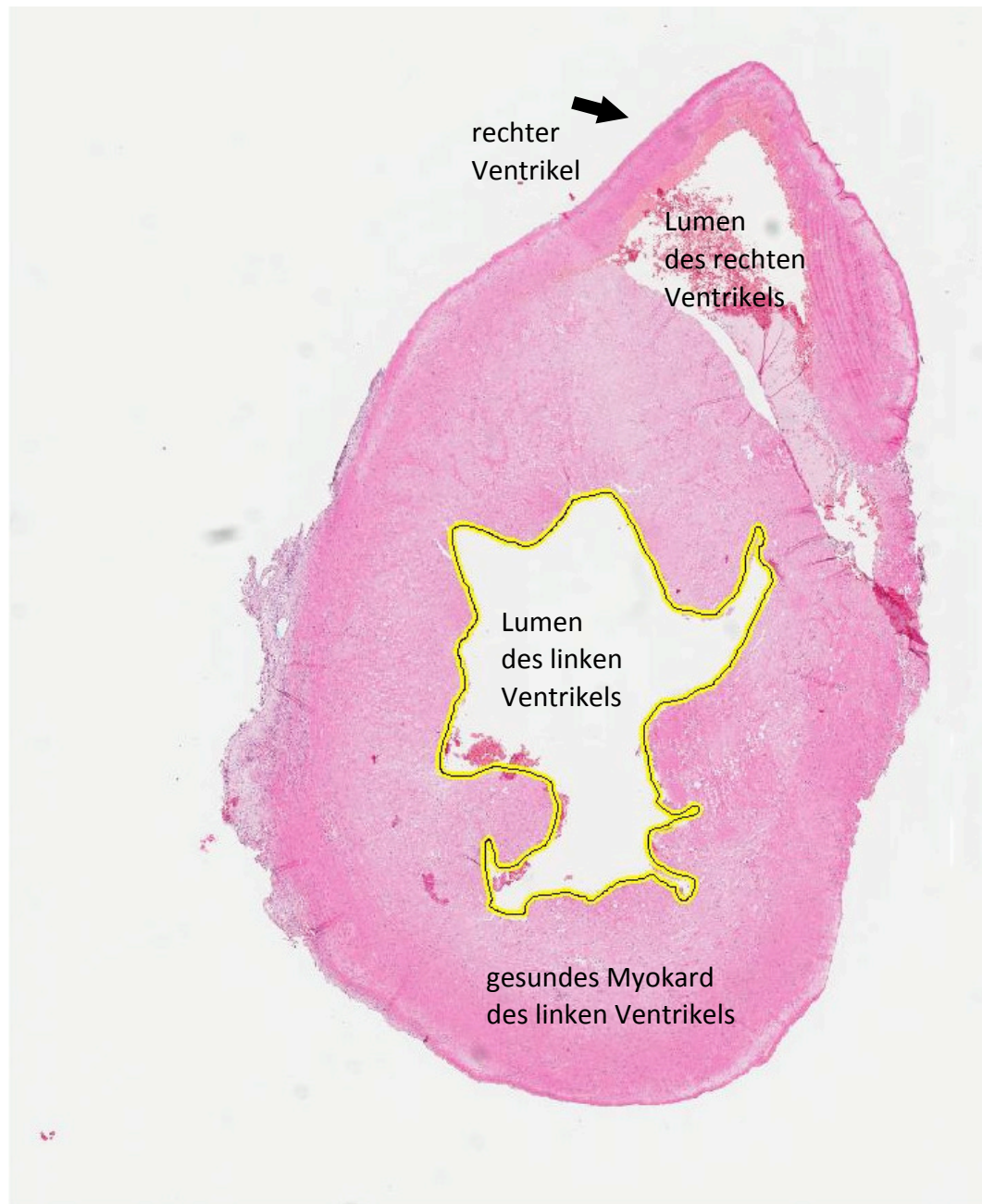


Abbildung 24: Axiale Schnittebene des linken Ventrikels; die gelbe Linie zeigt die Konturen des linken gesunden Myokards. In dieser Abbildung sind keine vom Infarkt betroffenen Areale dargestellt.

In **Abbildung 25** ist die Korrelationen der Infarktgröße zwischen PET und Histologie dargestellt. Im Versuch konnte eine sehr gute Korrelation festgestellt werden. Der Vergleich von der PET mit der Histologie wies mit einem Determinationskoeffizienten (R^2) 97% eine sehr gute Vergleichbarkeit auf. Die PET stellte eine genaue und reproduzierbarere Bestimmung der Infarktgröße nach einem MI dar.

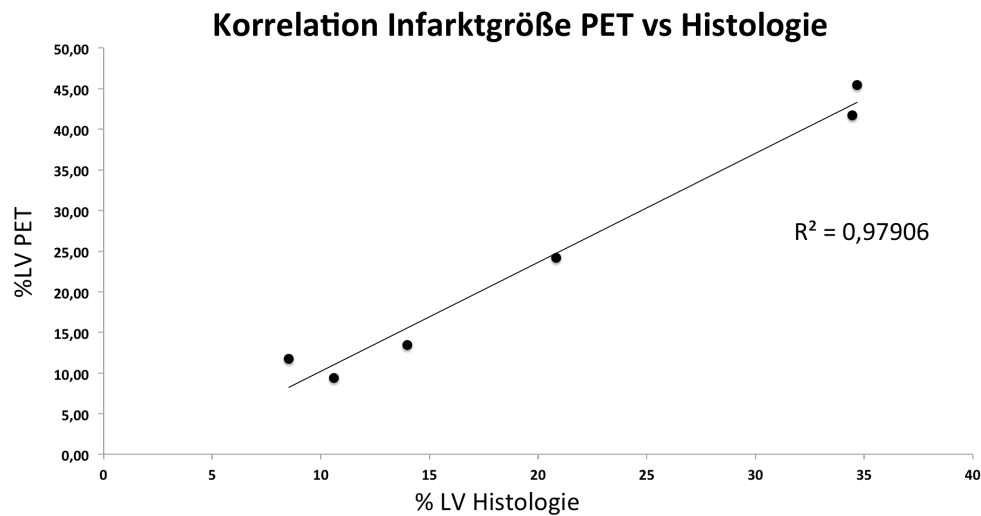


Abbildung 25: Korrelation der Infarktgrößen bei Histologie und PET (n=6).

7. Korrelation der LVEF Berechnung

Um die Vergleichbarkeit der Berechnung der LVEF im Rahmen der MRT Bildgebung sicherzustellen, wurde eine Korrelationsanalyse der Auswertung zweier Personen (Anna Bartels und Dr. Christoph Rischpler) durchgeführt (Interobserver-Variabilität). Beide Personen werteten blind 11 zufällig ausgewählte Mäuse aus.

In der Abbildung 26 ist die Korrelation der beiden Bestimmungen dargestellt. Der Vergleich von Person 1 und Person 2 weist mit einem Determinationskoeffizienten (R^2) von $R^2=0,8512$ eine sehr gute Vergleichbarkeit auf. Trotz der von zwei unabhängigen Personen ausgewerteten Ergebnisse spricht die gute Korrelation der beiden Berechnungen für eine korrekte und standardisierte Ausführung der Validierung der LVEF mit Hilfe des dafür vorgesehenen Programmes Munich Heart/MRI[®], sowie für ein sehr gutes Interobserver Agreement.

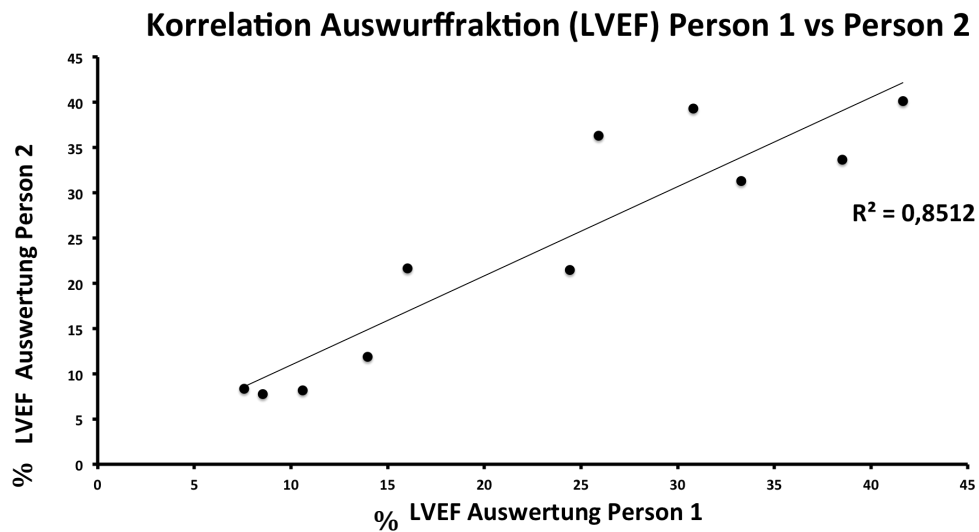


Abbildung 26: Korrelation der LVEF von Person 1 vs Person 2, $R^2=0,8512$ (n=11).

8. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde zusammen mit Dr. C. Rischpler von der Nuklearmedizinischen Klinik des Klinikums Rechts der Isar durchgeführt.

Die statistischen Zusammenhänge der ermittelten Daten beziehen sich auf die Unterschiede der in der Bildgebung erhobenen Parameter (Endsystolisches/end- diastolisches Volumen, Infarktgröße, Auswurffraktion) sowie auf die nach der Euthanasie der Tiere erhobenen Maße (Körpergewicht, Tibiallänge, Herzgewicht) und der unterschiedlichen Mortalität post OP zwischen den NLRP10^{-/-} und WT Mäusen, die anhand einer Überlebensrate nach Kaplan-Meier aufgezeigt wurde.

Alle Werte der zu vergleichenden Gruppendaten der NLRP10^{-/-} und der WT Gruppe wurden als Mittelwert (MW) mit dazugehöriger Standardabweichung (SD) angegeben. Zur Quantifizierung der Signifikanz der Unterschiede zwischen den WT und NLRP10^{-/-} Mäusen aus den Daten der Bildgebung wurde der

gepaarte bzw. ungepaarte Student-t-Test verwendet. Zur Darstellung der Entwicklung der Mäuse im Studienverlauf wurde der gepaarte Student t-Test innerhalb dieser Gruppe verwendet. Der ungepaarte Student t-Test wurde zum Vergleich der beiden Gruppen zu den jeweiligen Bildgebungszeitpunkten untereinander angewandt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. Signifikante Unterschiede innerhalb einer Gruppe oder zwischen den beiden Gruppen sind in den Diagrammen (siehe Kapitel IV. Ergebnisse) dargestellt. Alle Auswertungen Diagramme und Graphen wurden mit dem Programm Graphpad Prism 6 (Fa. GraphPad Software, Inc.) erstellt.

IV. ERGEBNISSE

1. Mortalität während des Studienverlaufs anhand einer Kaplan-Meier-Kurve

Wie Abbildung 27 zeigt, konnte eine signifikant höhere Mortalität ($p=0,0009$) der NLRP10^{-/-} Mäuse post OP im Vergleich zu den WT-Tieren beobachtet werden. 50% der NLRP10^{-/-} Mäuse überlebten die ersten vier Tage post OP nicht.

Im Detail: Insgesamt wurden 16 NLRP10 Mäuse operiert, wovon acht Tiere postoperativ verstarben (50%). Alle diese Mäuse verstarben innerhalb der ersten vier Tage post OP, wobei sich bei vier Mäusen bei der Sektion und Herzentnahme ein rupturierter linker Ventrikel als Todesursache herausstellte. Bei den anderen vier verstorbenen NLRP10^{-/-} Mäusen konnte bei der Sektion makroskopisch keine Ursache für das plötzliche Versterben der Tiere festgestellt werden.

Bei den WT Mäusen verstarben lediglich 2 von 14 operierten Mäusen (ca. 14%). Diese beiden Tiere verstarben in den ersten vier Tagen post OP. Bei der Sektion der Tiere konnte makroskopisch die Todesursache nicht festgestellt werden; es zeigte sich jedoch keine Ruptur des linken Ventrikels oder andere makroskopisch erkennbare Veränderungen am Herzen.

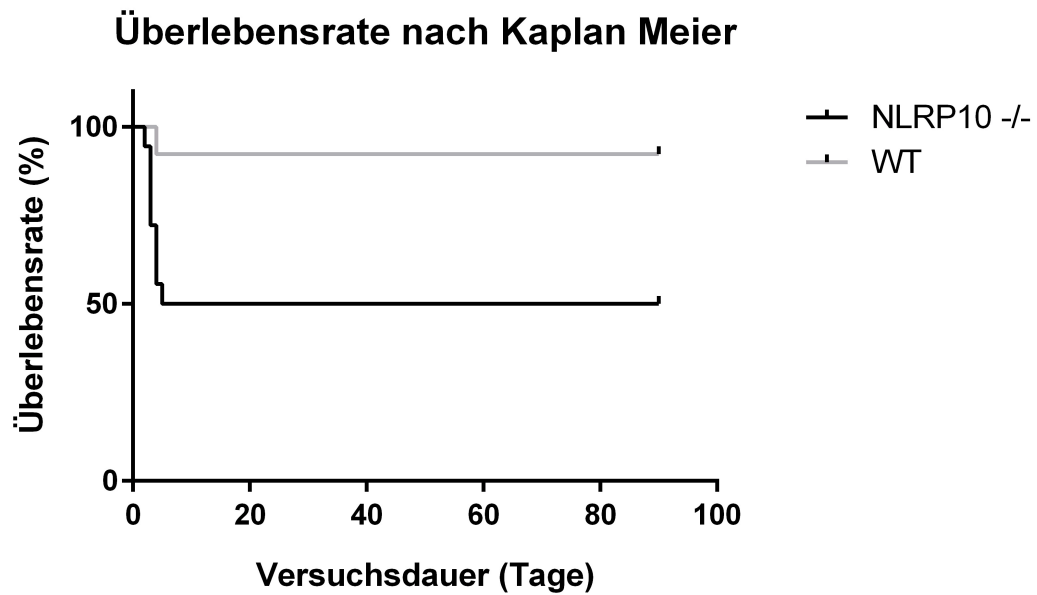


Abbildung 27: Kaplan-Meier-Kurve; Überlebensrate (%) der WT (n=14) und NLRP10^{-/-} (n=16) Mäuse post OP p=0,0009.

Bei den SHAM operierten Mäusen verstarben von den NLRP10^{-/-} Mäusen (n=6) und den WT (n=14) Mäusen zu keinem Zeitpunkt Tiere.

2. Bildgebung

2.1. Ergebnisse der Berechnung des enddiastolischen Volumens (EDV) und des endsystolischen Volumens (ESV) mittels MRT

Das enddiastolische Volumen (EDV) und das endsystolische Volumen (ESV) nahm nach Myokardinfarkt an Tag 5 vs Tag 21 innerhalb der NLRP10^{-/-} und der WT Gruppe signifikant zu (Abbildung 28). Allerdings zeigte der Vergleich der beiden Gruppen untereinander zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied in der EDV oder der ESV (Abbildung 29) (NLRP10^{-/-} EDV Tag 5: 84,6 μ l \pm 22,05, Tag 21: 103,5 μ l \pm 26,157, Tag 90: EDV 92,4 μ l \pm 20,7, ESV Tag 5: 57,5 μ l \pm 21,08, Tag 21: 81,0 μ l \pm 23,23, Tag 90: 72,4 μ l \pm 20,7; WT EDV Tag 5: 85,5 μ l \pm 11,48, Tag 21: 103,1 μ l \pm 19,44, Tag 90: 117,8 μ l \pm 36,74, ESV Tag 5: 58,0 μ l \pm 11,69, Tag 21: 73,5 μ l \pm 16,48, Tag 90: 85,7 μ l \pm 33,85).

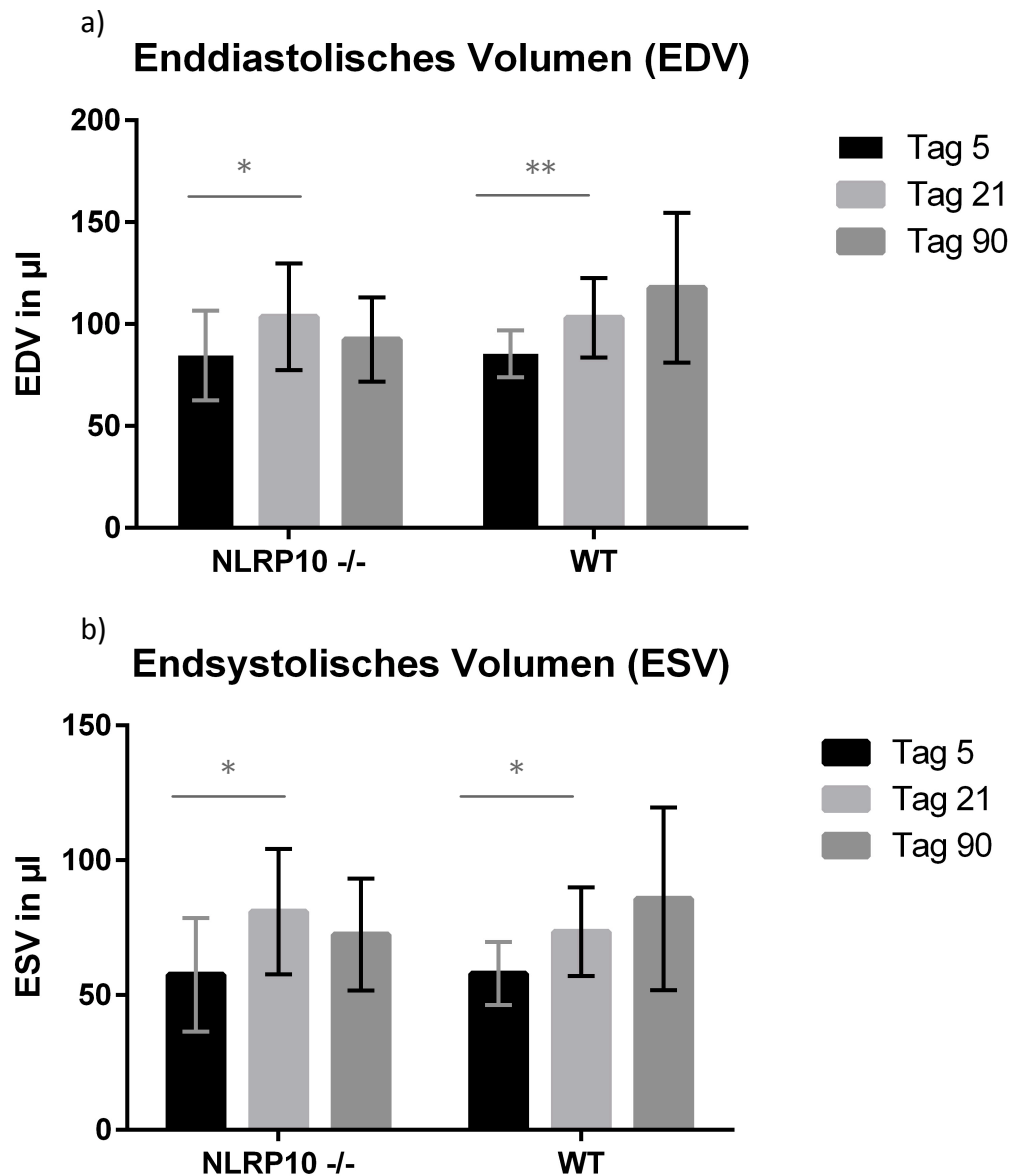
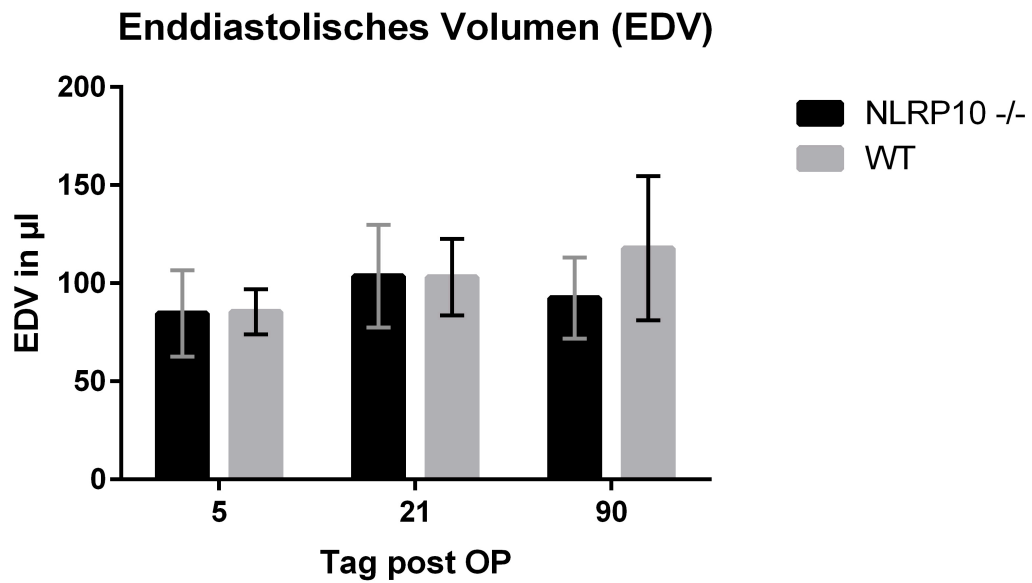


Abbildung 28: Vergleich des EDV (a) und ESV (b) von NLRP10^{-/-} (n=8) und WT (n=12), EDV; Tag 5 vs Tag 21 NLRP10^{-/-} p=0,04, WT p=0,008; ESV NLRP10^{-/-} p=0,02, WT p=0,01; Tag 5 vs Tag 90: NLRP10^{-/-} p=0,25, WT p=0,07; ESV NLRP10^{-/-} p=0,19, WT p=0,07; Tag 21 vs Tag 90: NLRP10^{-/-} p=0,76, WT p=0,30; ESV NLRP10^{-/-} p=0,84, WT p=0,29;

a)



b)

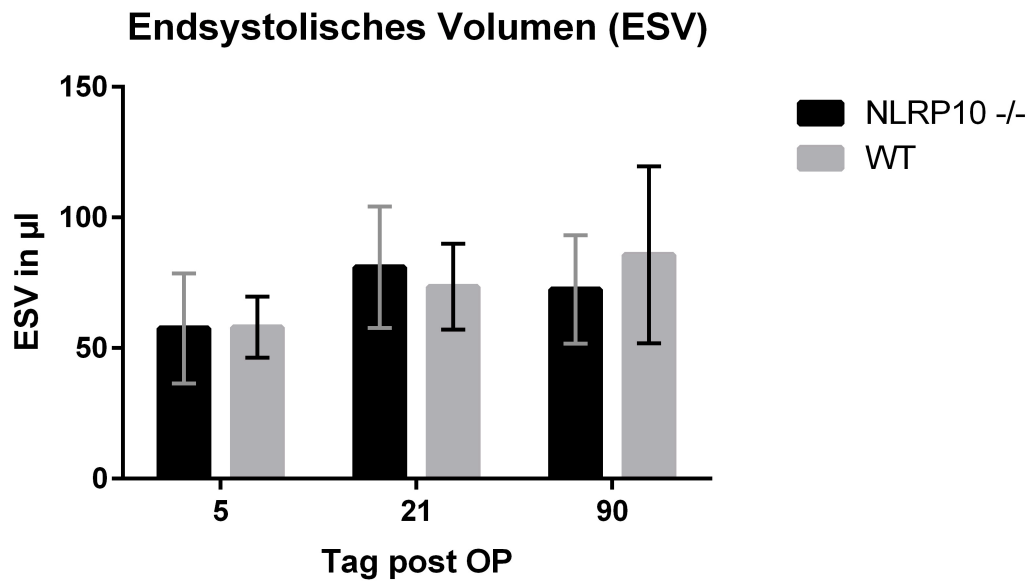


Abbildung 29: Vergleich des EDV (a) und ESV (b) an Tag 5: (EDV $p=0,67$, ESV $p=0,96$), Tag 21: (EDV $p=0,96$, ESV $p=0,49$) und Tag 90: (EDV $p=0,24$, ESV $p=0,50$) von NLRP10^{-/-} (n=8) und WT (n=12).

Das EDV und ESV bei den SHAM operierten Gruppen blieb dagegen über den gesamten Verlauf der Studie nahezu gleich. Zwischen NLRP10^{-/-} (EDV Tag 5: $84,6\mu\text{l}\pm 22,05$, Tag 21: $103,5\mu\text{l}\pm 26,157$, Tag 90: $92,4\mu\text{l}\pm 20,7$, ESV Tag 5: $57,5\mu\text{l}\pm 21,08$, Tag 21: $81,0\mu\text{l}\pm 23,23$, Tag 90: $72,4\mu\text{l}\pm 20,7$) und SHAM NLRP10-

/- (EDV Tag 5: $57\mu\text{l}\pm 4,26$, Tag 21: $59,3,5\mu\text{l}\pm 4,30$, Tag 90: $59,8\mu\text{l}\pm 4,06$, ESV Tag 5: $30,7\mu\text{l}\pm 5,05$, Tag 21: $31,9\mu\text{l}\pm 5,27$, Tag 90: $33,2\mu\text{l}\pm 4,12$), war, genau wie bei WT (EDV Tag 5: $85,5\mu\text{l}\pm 11,48$, Tag 21: $103,1\mu\text{l}\pm 19,44$, Tag 90: $117,8\mu\text{l}\pm 36,74$, ESV Tag 5: $58,0\mu\text{l}\pm 11,69$, Tag 21: $73,5\mu\text{l}\pm 16,48$, Tag 90: $85,7\mu\text{l}\pm 33,85$) und SHAM WT (EDV Tag 5: $64,1\mu\text{l}\pm 6,97$, Tag 21: $72,2\mu\text{l}\pm 7,49$, Tag 90: $74,8\mu\text{l}\pm 7,2$, ESV Tag 5: $30,4\mu\text{l}\pm 4,34$, Tag 21: $72,2\mu\text{l}\pm 7,49$, Tag 90: $39,7\mu\text{l}\pm 7,93$), ein signifikanter Unterschied bezüglich der EDV und ESV im Studienverlauf zu sehen (Abbildung 30 und Abbildung 31).

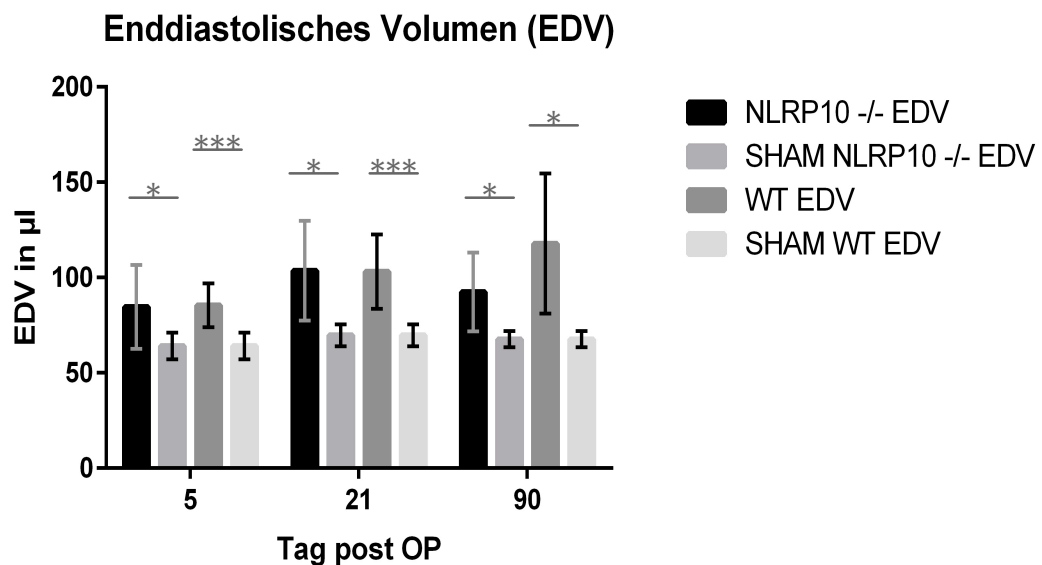


Abbildung 30: Vergleich des EDV an Tag 5, 21 und 90 von NLRP10-/- (n=8), SHAM NLRP10-/- (n=6) Tag 5: p=0,08, Tag 21: p= 0,01, Tag 90: p=0,05; WT (n=12) und SHAM WT (n=14)) Tag 5: p=0,00005 Tag 21: p= 0,0003, Tag 90: p=0,02.

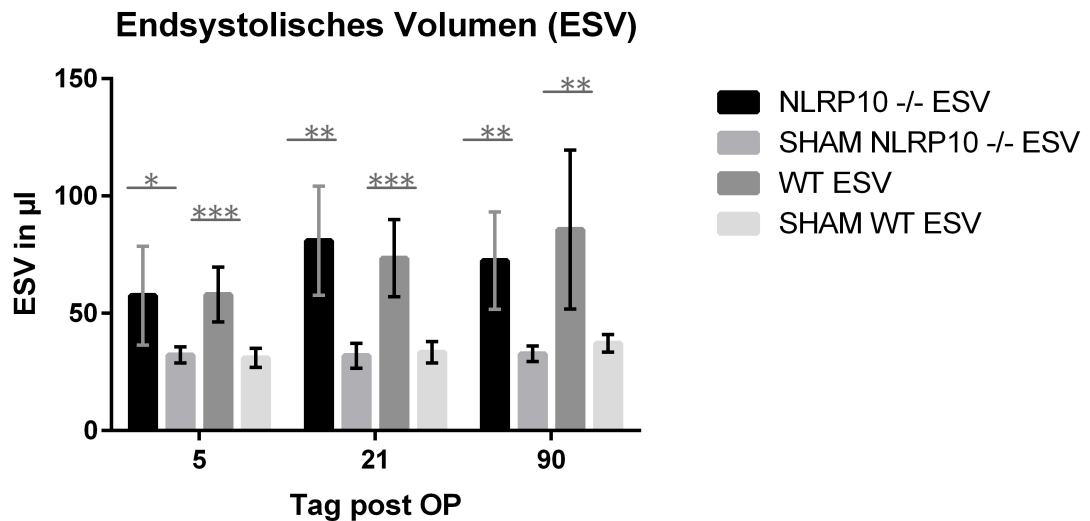


Abbildung 31: Vergleich des ESV an Tag 5, 21 und 90 von NLRP10^{-/-} (n=8), SHAM NLRP10^{-/-} (n=6) Tag 5: p=0,04 Tag 21: p= 0,003, Tag 90: p=0,009; WT (n=12) und SHAM WT (n=14) Tag 5: p=0,000025 Tag 21: p= 0,00001, Tag 90: p=0,02.

Zwischen den beiden Gruppen von SHAM NLRP10^{-/-} (EDV Tag 5: 57 $\mu\text{l}\pm 4,26$, Tag 21: 59,3,5 $\mu\text{l}\pm 4,30$, Tag 90: 59,8 $\mu\text{l}\pm 4,06$, ESV Tag 5: 30,7 $\mu\text{l}\pm 5,05$, Tag 21: 31,9 $\mu\text{l}\pm 5,27$, Tag 90: 33,2 $\mu\text{l}\pm 4,12$) und SHAM WT Mäusen (EDV Tag 5: 64,1 $\mu\text{l}\pm 6,97$, Tag 21 72,2 $\mu\text{l}\pm 7,49$, Tag 90 74,8 $\mu\text{l}\pm 7,2$, ESV Tag 5 30,4 $\mu\text{l}\pm 4,34$, Tag 21: 72,2 $\mu\text{l}\pm 7,49$, Tag 90: 39,7 $\mu\text{l}\pm 7,93$) konnte zu keinem Bildgebungszeitpunkt ein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abbildung 32).

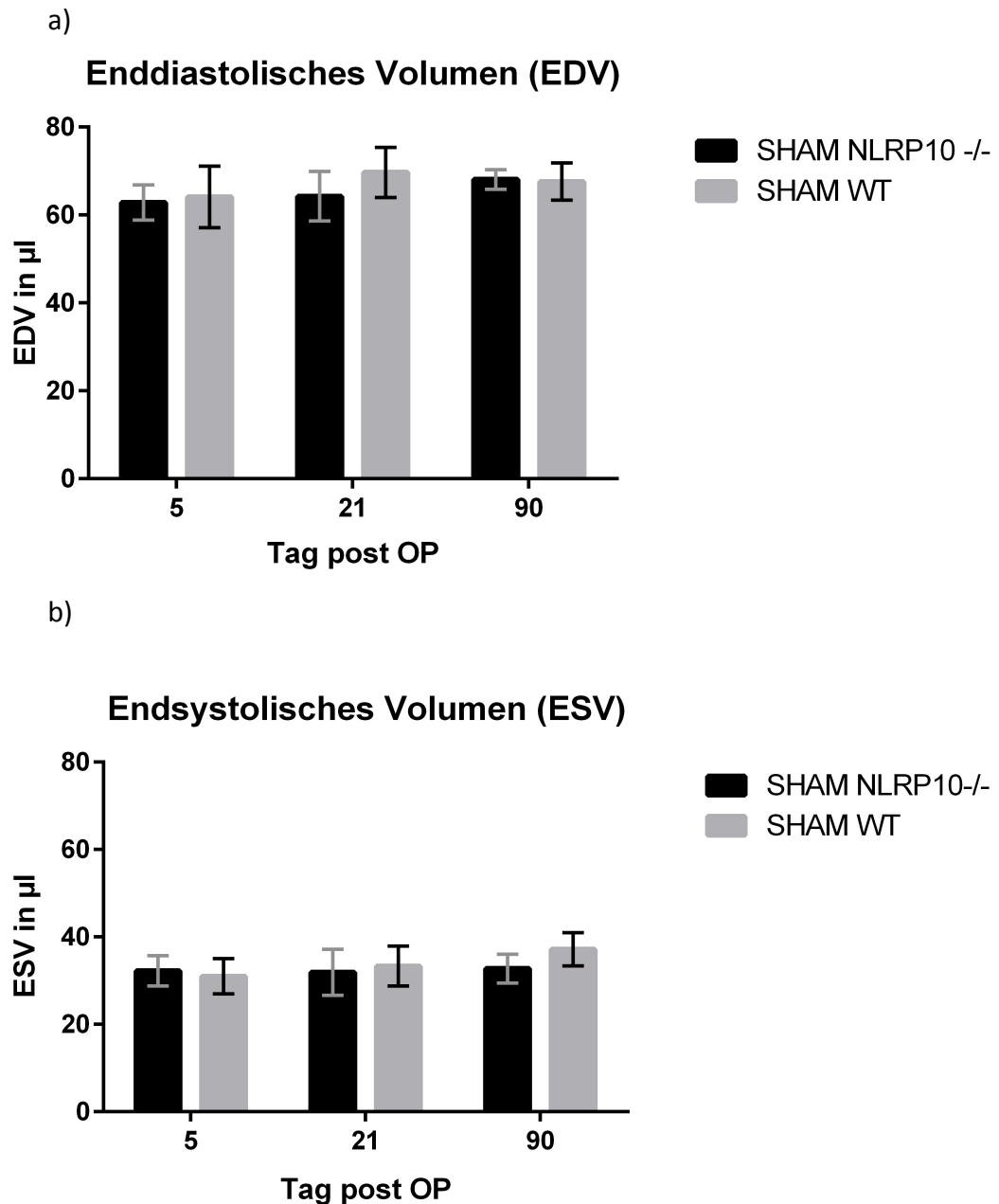


Abbildung 32: Vergleich des EDV (a) (Tag 5: $p=0,09$, Tag 21: $p=0,18$, Tag 90: $p=0,09$) und ESV (b) (Tag 5: $p=0,90$, Tag 21: $p=0,19$, Tag 90: $p=0,19$) der beiden SHAM operierten Gruppen (SHAM NLRP10^{-/-} $n=6$, SHAM WT $n=14$).

2.2. Ergebnisse der Berechnung der Auswurffraktion (LVEF) mittels MRT

Die Berechnung der Auswurffraktion (LVEF) anhand der CINE Sequenzen der MRT Messungen der beiden Gruppen NLRP10^{-/-} und WT ergab zu keinem Bildgebungszeitpunkt (Tag 5, Tag 21, Tag 90) einen signifikanten Unterschied (NLRP10^{-/-} vs WT Tag 5: 28,1%±6,0 vs 32,3%±8,1, Tag 21: 23,5%±6,5 vs 29,0%±4,4, Tag 90: 22,2%±7,9 vs 28,8%±7,6). Die beiden SHAM operierten Gruppen zeigten deutlich, dass sich die LVEF über den gesamten Verlauf der Studie in beiden Gruppen nicht signifikant veränderte (SHAM NLRP10^{-/-} Tag 5: 48,8%±5,6, Tag 21: 48,7%±5,7, Tag 90: 48,9%±6,8 und SHAM WT Tag 5: 52,3%±3,9, Tag 21: 48,3%±5,3, Tag 90: 49,8%±2,6) (Abbildung 33).

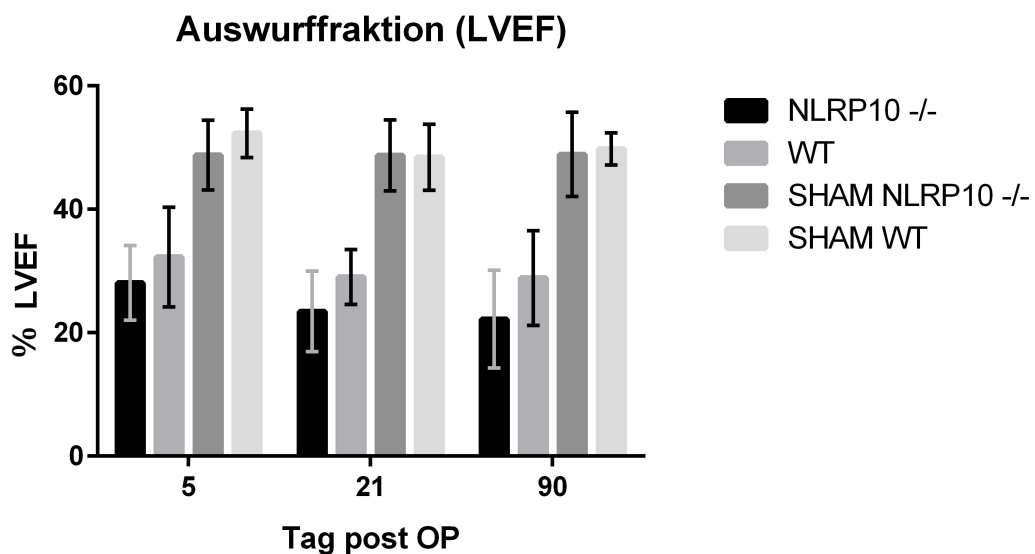


Abbildung 33: Vergleich der LVEF zwischen NLRP10^{-/-} (n=8), WT (n=12) (NLRP10^{-/-} vs WT Tag 5: p=0,22, Tag 21: p=0,07, Tag 90: p=0,22), SHAM NLRP10^{-/-} (n=6) und SHAM WT (n=14) an Tag 5, 21 und 90 (SHAM NLRP10^{-/-} vs SHAM WT Tag 5: p=0,16, Tag 21: p=0,92, Tag 90: p=0,83).

Beim Vergleich der unterschiedlichen Bildgebungszeitpunkte (Tag 5, Tag 21, Tag 90), konnte innerhalb der Gruppe der NLRP10^{-/-} Mäuse eine signifikante homogene Abnahme der LVEF ermittelt werden (NLRP10^{-/-} Tag 5: 28,1%±6,0, Tag 21: 23,5%±6,5, Tag 90: 22,2%±7,9). Bei den WT Mäusen zeigte sich beim

Vergleich der unterschiedlichen Bildgebungszeitpunkte ebenfalls eine Abnahme der LVEF, diese war allerdings nicht signifikant (WT Tag 5: $32,3\% \pm 8,1$, Tag 21: $29,0\% \pm 4,4$, Tag 90: $28,8\% \pm 7,6$) (Abbildung 34 und Abbildung 35).

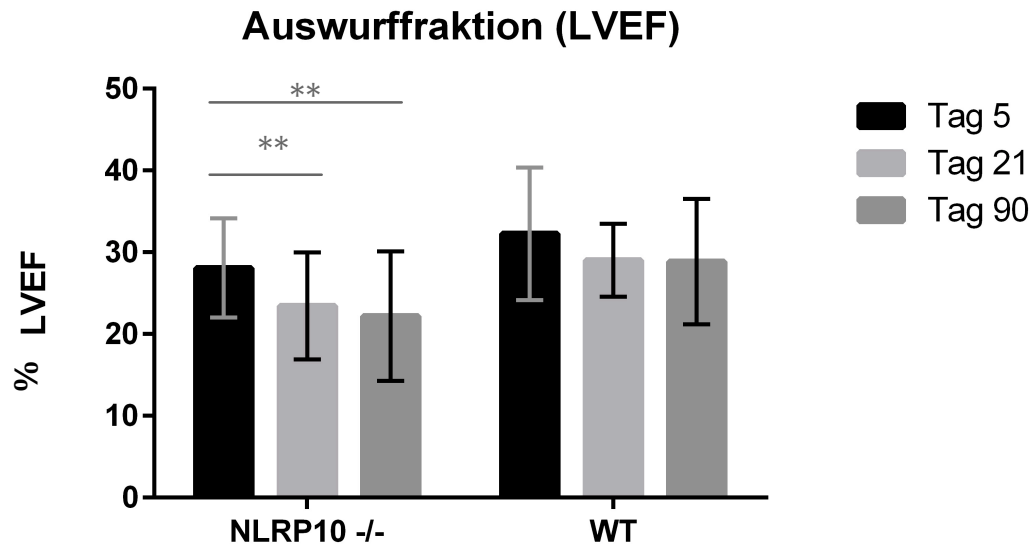


Abbildung 34: Vergleich der LVEF zwischen NLRP10^{-/-} (n=8) und WT (n=12) an Tag 5, 21 und 90 (NLRP10^{-/-} Tag 5 vs Tag 21: p=0,003; Tag 21 vs Tag 90: p= 0,892; Tag 5 vs Tag 90: p=0,005; WT Tag 5 vs Tag 21: p=0,234; Tag 21 vs Tag 90: p= 0,819; Tag 5 vs Tag 90: p=0,254).

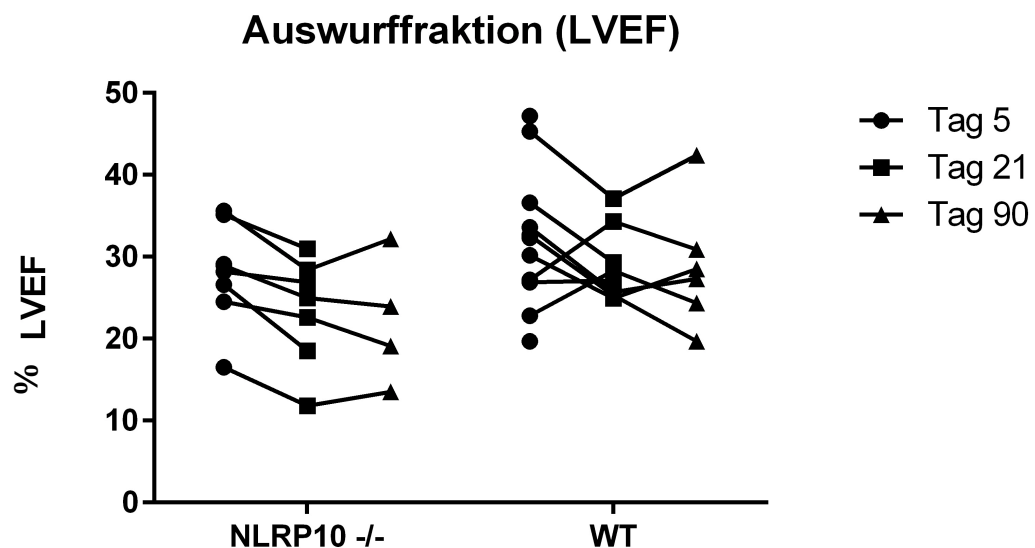


Abbildung 35: Darstellung der einzelnen Mäuse im Studienverlauf, NLRP10^{-/-} (n=8) und WT (n=12).

2.3. Infarktgrößenbestimmung mittels Positronenemissionstomographie (PET)

Die Infarktgrößenbestimmung erfolgte durch die Positronenemissionstomographie (PET). Die Bildgebungszeitpunkte an den Tagen 5, 21 und 90 post OP wurden bei allen Mäusen nach dem gleichen Schema durchgeführt. Dadurch war die Darstellung eines möglichen Unterschieds zu jedem Bildgebungszeitpunkt in Bezug auf die Infarktgröße zwischen NLRP10^{-/-} und WT Mäusen möglich.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied in der Infarktgröße zwischen NLRP10^{-/-} (Tag 5: 27,2%±11,04, Tag 21: 27,8%±11,04, Tag 90: 28,3±) und WT Mäusen (Tag 5: 33,4%±12,68, Tag 21: 27,8%±13,38, Tag 90: 38%±7,78) (Abbildung 36).

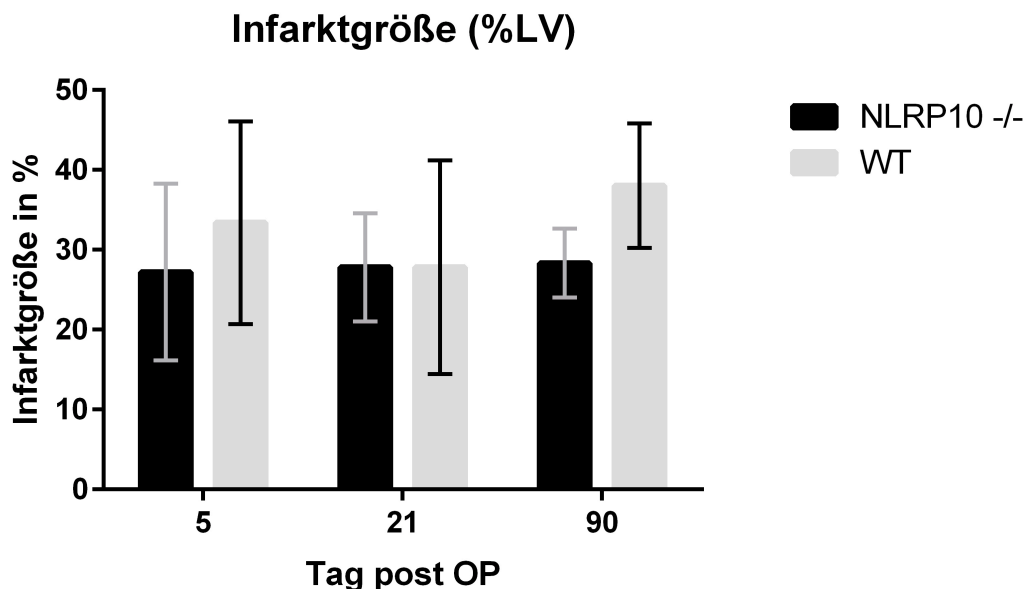


Abbildung 36: Vergleich der Infarktgröße von WT (n=12) und NLRP10^{-/-} (n=8) an Tag 5 (p=0,38), 21 (p=0,99) und 90 (p=0,18).

Besonders hervorzuheben ist Tag 5 als erster Bildgebungszeitpunkt post OP (Abbildung 37). Eine mögliche Fehlerquelle bezüglich der Operationstechnik wäre hier zu erkennen gewesen. Hätten sich die Infarktgrößen an Tag 5 signifikant unterschieden wäre von einer nicht vergleichbaren Operationstechnik und somit von nicht vergleichbaren Ausgangsgrößen auszugehen gewesen. Zwischen NLRP10^{-/-} und den WT Mäusen war an Tag 5 kein signifikanter Unterschied in der Infarktgröße festzustellen (NLRP10^{-/-}: 27,2%±11,04, WT: 33,4%±12,68; p=0,38).

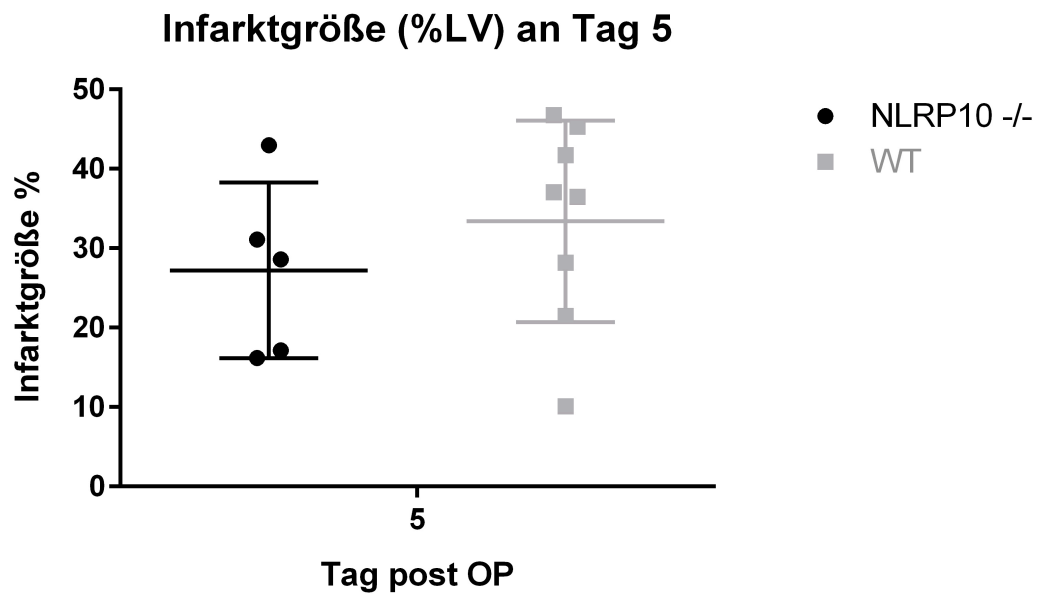


Abbildung 37: Vergleichbare Infarktgröße an Tag 5 post OP bei beiden Gruppen (WT n=12, NLRP10^{-/-} n=8, p=0,38).

3. Körpergewicht (KGW) / Herzgewicht (HGW) / Tibiallänge (TL)

Alle Mäuse wurden an Tag 90 euthanasiert und die Parameter HGW, KGW, TL wurden erhoben. Zu diesem Zeitpunkt konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich dieser Parameter zwischen WT (KGW 27,1g±4,02, HGW: 0,2g±0,07, TL: 23,0mm±0,46) und NLRP10^{-/-} (KGW: 28,7g±4,53, HGW: 0,2g±0,03, TL: 23,0mm±0,66) Mäusen festgestellt werden.

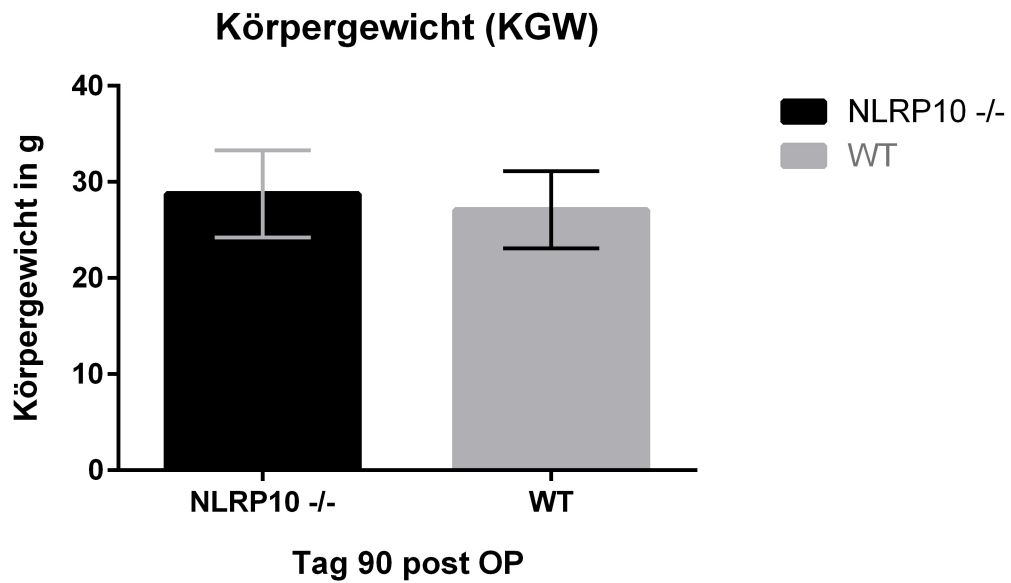


Abbildung 38: Vergleich des Körpergewichts von WT (n=12) und NLRP10-/- (n=8) an Tag 90 (p=0,54).

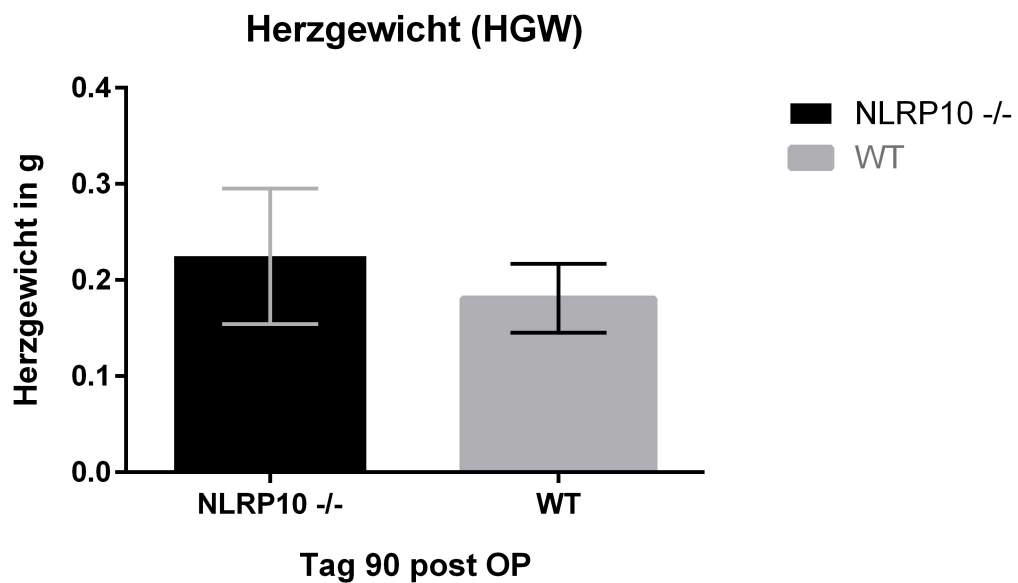


Abbildung 39: Vergleich des Herzgewichts von WT (n=12) und NLRP10-/- (n=8) an Tag 90 (p=0,19).

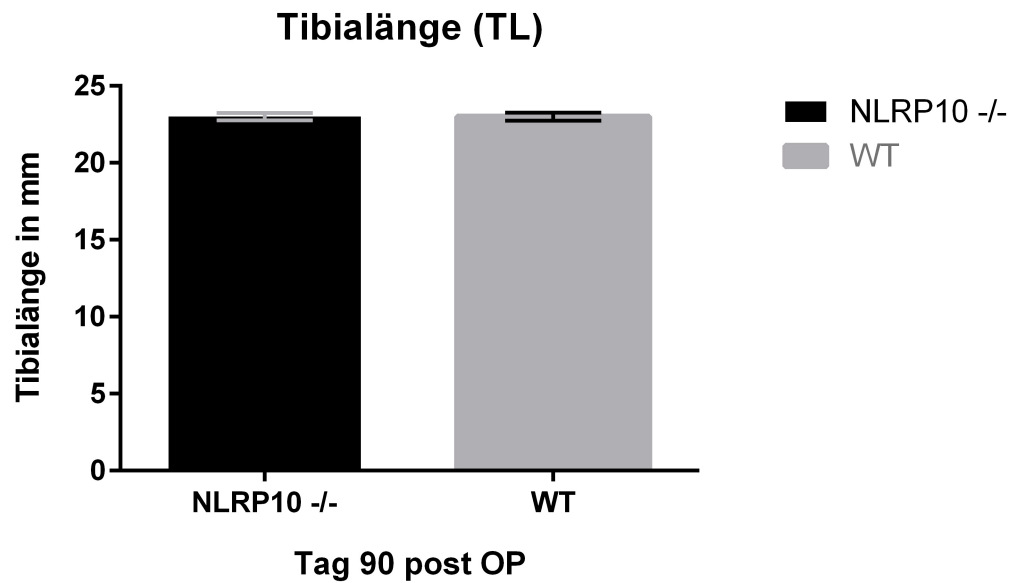


Abbildung 40: Vergleich der Tibiallänge von WT (n=12) und NLRP10-/- (n=8) an Tag 90 (p=1).

Der Vergleich des HGWs an Tag 90 zwischen den operierten Gruppen (Tag 90 HGW: NLRP10-/- $0,2g \pm 0,03$, WT $0,2g \pm 0,07$) und den dazugehörigen SHAM operierten Mäusen (Tag 90 HGW: SHAM NLRP10-/- $0,13g \pm 0,01$, SHAM WT $0,14 \pm 0,009$) zeigte einen signifikanten Unterschied (Abbildung 41).

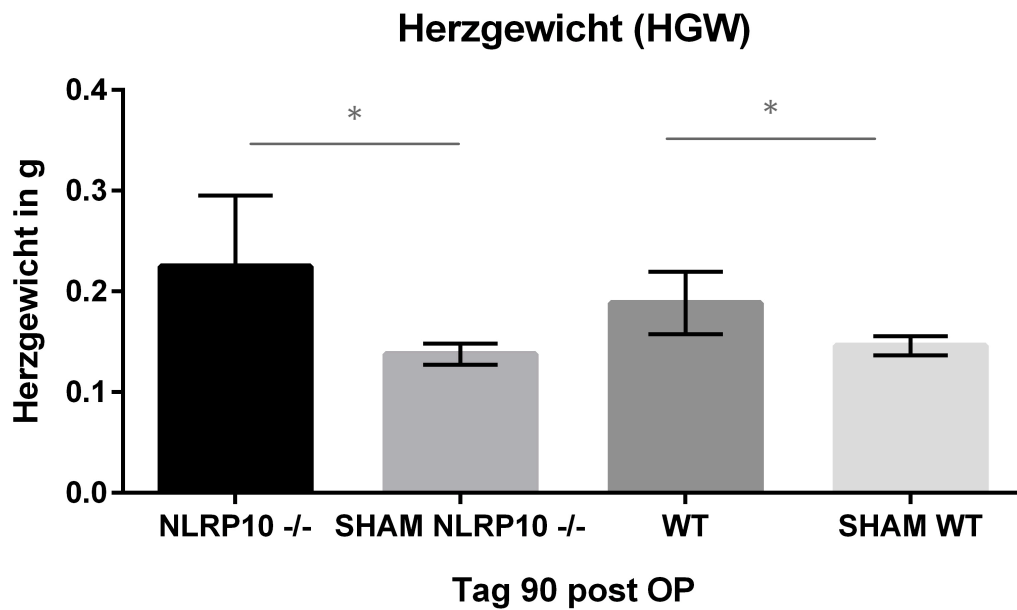


Abbildung 41: Vergleich des Herzgewichts an Tag 90 von NLRP10^{-/-} (n=8) und SHAM NLRP10^{-/-} (n=6) p=0,05; WT (n=12) und SHAM WT (n=14) p=0,05.

Die Parameter KGW (NLRP10^{-/-}: 28,7g±4,53 und WT: 27,1g±4,02) und TL (NLRP10^{-/-}: 23,0mm±0,46 und WT: 23,0mm±0,66) unterschieden sich an Tag 90 post OP nicht signifikant (Abbildung 42). SHAM NLRP10^{-/-} und SHAM WT zeigten ebenfalls keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf KGW (SHAM NLRP10^{-/-}: 28,0g±3,18 und SHAM WT: 28,6g±3,21) HGW (SHAM NLRP10^{-/-}: 0,13g±0,01 und SHAM WT: 0,14g±0,009) und TL (SHAM NLRP10^{-/-}: 23,2mm±0,29 und SHAM WT: 23,2mm±0,45) an Tag 90 post OP (Abbildung 43).

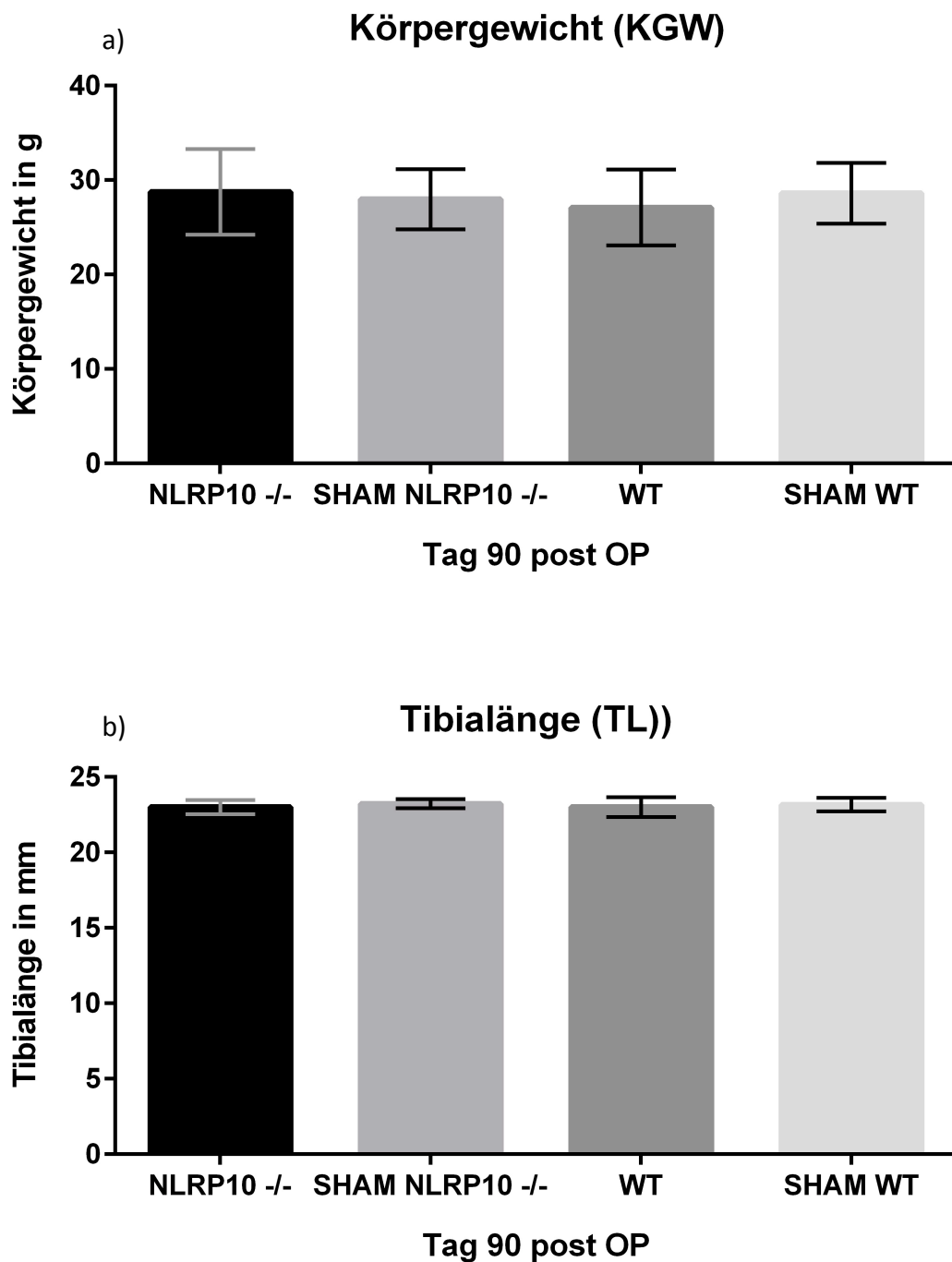


Abbildung 42 Vergleich des Körpergewichts (a) und der Tibiallänge (b) an Tag 90 NLRP10^{-/-} (n=8), SHAM NLRP10^{-/-} (n=6) (KGW: p=0,79, TL: p=0,44), WT (n=12) und SHAM WT (n=14) (KGW: p=0,58, TL: p=0,70).

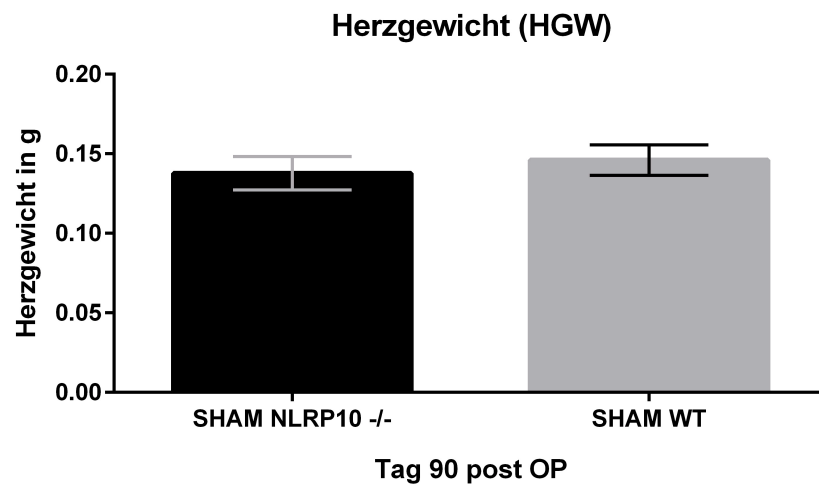


Abbildung 43: Vergleich des Herzgewichts ($p=0,33$) von SHAM NLRP10^{-/-} (n=6) und SHAM WT (n=14).

V. DISKUSSION

1. Diskussion der Methodik

1.1. LAD Ligation

Das Vorliegen eines MI war die Voraussetzung für die Durchführung dieser Arbeit. Durch die LAD Ligation können einige Fehlerquellen entstehen, die in dieser Studie durch folgende Maßnahmen auf ein Minimum reduziert werden konnten. Alle Mäuse wurden stets von der gleichen Person und nach immer der gleichen Operationsmethodik operiert. Die OPs wurden als Blindstudie durchgeführt, das bedeutet, die Mäuse befanden sich in genotypgemischten Käfigen und waren äußerlich nicht zu unterscheiden. Es wurden nur Mäuse des gleichen Genotyps bzw. deren Littermate WT miteinander verglichen. Dadurch wurde sichergestellt, dass ein vergleichbarer genetischer Hintergrund besteht. Wie bei Tarnavski et al. beschrieben, stellt die biologische Variation eine große Fehlerquelle in Bezug auf die Durchführung der LAD Ligation dar (Tarnavski et al. 2004).

Für eine standardisierte OP Methodik sprach auch die Sterblichkeitsrate der WT Mäuse, die unter 10% lag. Die Forschergruppe um Tarnavski beschreibt eine Überlebensrate von ca. 93% bei einer standardisierten OP Durchführung (Tarnavski et al. 2004).

Der bei NLRP10^{-/-} und WT nicht signifikante Unterschied der Infarktgröße an Tag 5 post OP, bestätigte die einheitliche Durchführung der OP Methode. Es konnte von einer vergleichbaren Infarktgröße der beiden Gruppen ausgegangen werden.

Trotz dieser Maßnahmen waren individuelle Unterschiede in der Lage der LAD Arterie von Tier zu Tier zu beobachten. Dadurch entstanden unvermeidlich Unterschiede in den Infarktgrößen. Bei der NLRP10^{-/-} Gruppe gab es an Tag 5 eine mittlere Infarktgröße von 27,2% mit einer SD von $\pm 11,04$ und bei den WT Mäusen 33,4% mit einer SD von $\pm 12,68$. Trotz dieser Abweichungen waren keine signifikanten Unterschiede in der Infarktgröße zwischen den beiden Gruppen zu erkennen, was wiederum für eine vergleichbare Operation spricht.

Aus tierschutzrechtlichen Gründen wurden die Gruppengrößen so berechnet, dass

so wenig wie möglich Tiere verwendet werden mussten, trotzdem aber signifikante Ergebnisse erzielt werden konnten. Post operativ wurde jedes Tier engmaschig überwacht und ausreichend mit Schmerzmitteln behandelt. Durch die mehrmalige Bildgebung eines Tieres (Tag 5, 21 und 90) war es möglich, sowohl die Gruppengröße zu reduzieren als auch die Entwicklung jedes einzelnen Tieres zu beobachten.

1.2. Krankheitsmodell NLRP10-/-

Die Durchführung der LAD Ligation ist in der Literatur an vielen Tieren (Maus, Ratte, Schwein, Hund) beschrieben (Klocke et al. 2007). Trotz der limitierenden Herzgröße und den strukturellen Unterschieden des kardiovaskulären Systems im Gegensatz zum Menschen, ist die Maus das einzig geeignete Tiermodell für diese Arbeit. Denn neben den Vorteilen der hohen Geburtenrate und der kurzen Trächtigkeitsdauer, ist die Maus der einzige Organismus, der es ermöglicht die sogenannten Knockout-Linien zu züchten (Zaragoza et al. 2011). Ein Knockout des NLRP10 Gens war die Voraussetzung für die Durchführung dieser Studie.

Wie am Beispiel von Eisenbarth et al. (2012) zu sehen ist, ist die Zucht solcher KO Modelle mit Risiken verbunden. In der Veröffentlichung von 2012 definierte die Forschergruppe dendritische Zellen als Interaktionspartner von NLRP10 und erklärte somit die Funktionsweise dieses Proteins. Im Jahr 2015 zeigte die gleiche Forschergruppe, dass es sich bei diesem vermeintlichen Interaktionspartner um eine Punktmutation, die während der Zucht der NLRP10-/- Mauslinie entstanden ist, handelt (Krishnaswamy et al. 2015). Offenbar züchteten die Forscher die Mäuse ausschließlich homozygot und nutzten nur unabhängig generierte Mäuse als Kontrollen. Dadurch konnte sich eine Mutation auf einem anderen Chromosom entwickeln, was sich auf die gesamte Linie ausbreitete.

Durch die Zucht der Mauslinie NLRP10-/-, wie sie am Institut für klinische Chemie von der Gruppe um PD Dr. O. Groß am Klinikum Rechts der Isar durchgeführt wird, werden solche Mutationen verhindert. Es wird nur nach dem Schema Heterozygot x Heterozygot gezüchtet und es werden ausschließlich Littermaten (also wurfinterne Mäuse) als Kontrollen verwendet. Mit einer Regentypisierung jeder Maus nach Versuchsende wird der Genotyp anhand einer Schwanzbiopsie nochmals überprüft und sichergestellt, dass es sich um den zuvor

bestimmten Genotyp handelt.

2. Diskussion der Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe von MRT und PET Bildgebung, mögliche Unterschiede im Remodeling nach einem MI zwischen NLRP10^{-/-} und WT Mäusen darzustellen.

Folgende Ergebnisse konnten gezeigt werden:

- Signifikant erhöhte Mortalität innerhalb der ersten vier Tage der NLRP10^{-/-} Mäuse im Gegensatz zur WT Kohorte.
- Keine signifikanten Unterschiede im Gruppenvergleich bezüglich des EDV und ESV zwischen NLRP10^{-/-} und WT während des gesamten Studienverlaufs.
- Im Gruppenvergleich konnte zu keinem Bildgebungszeitpunkt ein signifikanter Unterschied in der LVEF zwischen NLRP10^{-/-} Mäusen und WT Kontrollgruppe dargestellt werden. Beim Vergleich der unterschiedlichen Bildgebungszeitpunkte konnte innerhalb der Gruppe der NLRP10^{-/-} Mäuse, auf Grund einer geringeren Streuung der Daten (Homogenität), eine signifikante Abnahme der LVEF ermittelt werden. Bei den WT Mäusen zeigte sich beim Vergleich der unterschiedlichen Bildgebungszeitpunkte ebenfalls eine Abnahme der LVEF, diese war aber auf Grund der größeren Streuung der Daten nicht signifikant.
- Kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Infarktgröße zwischen NLRP10^{-/-} und WT Mäusen zu jedem Bildgebungszeitpunkt.
- Kein signifikanter Unterschied des Körpergewichts, des Herzgewichts und der Tibialänge zwischen der NLRP10^{-/-} Gruppe und der WT Gruppe zu jedem Bildgebungszeitpunkt.

2.1. Erhöhte Mortalität der NLRP10^{-/-} Mäuse

Die Kaplan-Meier-Kurve zeigt (Abbildung 27), dass eine signifikant erhöhte Mortalität der NLRP10^{-/-} Mäuse im Vergleich zur WT Gruppe besteht (p=0,0009). 50% (8 der 16 operierten Mäuse) der NLRP10^{-/-} Mäuse starben in

den ersten vier Tagen post OP. Im Gegensatz dazu starben bei den WT Mäusen nur unter 10% (2 von 14 operierten Mäusen) im gleichen Zeitraum. Bei vier der verstorbenen NLRP10^{-/-} Mäusen stellte sich bei der Sektion und Herzentnahme ein rupturierter Ventrikel als Todesursache heraus, während die Ursache für ein plötzliches Versterben der übrigen Tiere makroskopisch nicht festgestellt werden konnte. Sowohl bei den NLRP10^{-/-} SHAM operierten Mäusen als auch bei den WT SHAM operierten Mäusen verstarb zu keinem Zeitpunkt des Versuchs eine Maus.

In der Literatur ist eine Mortalität bei nicht genetisch veränderten Mäusen von bis zu 20% innerhalb der ersten Woche beschrieben. Auch wird ein rupturierter Ventrikel als Todesursache genannt (Yang et al. 2002). Die Mauslinie NLRP10^{-/-} wurde in der Literatur noch nie für das LAD Ligationsmodell verwendet, weswegen es zum Zeitpunkt dieser Arbeit keinen Vergleich in Bezug auf die erhöhte Mortalität dieses Genotyps gab. Eine erhöhte Mortalität nach LAD Ligation der NLRP10^{-/-} Mäuse im Gegensatz zu der in der Literatur beschriebenen normalen Mortalitätsrate bei nicht genetisch veränderten Mäusen und der WT Kohorte in dieser Studie kann, trotz fehlender Vergleichswerte in der Literatur, als auffällig gewertet werden. Auch muss beachtet werden, dass eine erhöhte Mortalität vor Tag 5 (dem Tag der 1. Bildgebung) darauf schließen lässt, dass für die Auswertung der linksventrikulären Funktion im Verlauf nur die „gesünderen“ NLRP10^{-/-} - Tiere zur Verfügung standen, was sehr wahrscheinlich einen Selektionsbias zuungunsten der in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse mit sich bringen könnte.

Das Fehlen von NLRP10^{-/-} in diesem Krankheitsmodell und das gleichzeitige Auftreten einer erhöhten Sterblichkeitsrate im Gegensatz zur Kontrollgruppe kann einen Hinweis auf eine mögliche antiinflammatorische Aktivität von NLRP10 liefern. Es scheint, dass das Myokard der NLRP10 defizienten Mäuse post MI möglicherweise ein ungünstigeres Remodeling aufweist, welches eine Ruptur des linken Ventrikels oder ein akutes Herzversagen begünstigen könnte.

Eine protektive Rolle des NLRP10^{-/-} wurde in Bezug auf bakterielle Infektionen bereits veröffentlicht. So befassten sich Lautz et al. (2012) mit der hohen basalen Expression von NLRP10 auf der Haut. Die Gruppe zeigte in vitro die protektive Rolle von NLRP10^{-/-} in humanen dermalen Fibroblasten gegenüber einer bakteriellen Inflammation. Joly et al. beschäftigt sich 2012 mit der Rolle von

NLRP10^{-/-} in Bezug auf eine *Candida albicans* Infektion und demonstriert einen schwerwiegenden Defekt von NLRP10^{-/-} defizienten Mäusen bei der Immunantwort der T- Helferzelle 1 (Th1).

2.2. Vergleichbare Zunahme des EDV/ESV

Nach einem linksventrikulären MI dilatiert die linke Herzkammer im Falle eines nachteiligen Remodelings nach und nach, dadurch ist ein erhöhtes ESV sowie ein erhöhtes EDV zu erwarten (Yang et al. 2002). Wie in der Literatur beschrieben, steigt auch in dieser Arbeit das EDV und ESV nach Ligatur der LAD sowohl bei den NLRP10^{-/-} als auch bei den WT Mäusen. Entscheidend an diesen Messungen ist, dass der Vergleich zwischen den beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied zeigt. Die Entwicklung bezüglich der EDV und ESV nach einem MI scheint zwischen NLRP10^{-/-} und WT vergleichbar.

Wie bei allen anderen gemessenen Parametern gibt es keine vergleichende Literatur, die diese Ergebnisse für dieses Krankheitsmodell verifizieren könnte.

Bei den SHAM operierten Mäusen ist kein signifikanter Unterschied zwischen SHAM NLRP10^{-/-} und SHAM WT festzustellen. Die Werte des EDVs und des ESVs der beiden Gruppen sind vergleichbar mit den in der Literatur beschriebenen Werten. In „The Laboratory mouse“ werden folgende Volumina angegeben, die ebenfalls im MRT gemessen wurden: EDV: $63,6\mu\text{l}\pm 6,6$ und ESV: $23,5\mu\text{l}\pm 4,4$ (Hedrich 2004). Der Mittelwert der Daten aus den MRT Messungen dieser Studie stimmt gut mit diesen Werten überein. So ergibt sich für die SHAM NLRP10^{-/-} Gruppe ein MW aller gemessenen Zeitpunkte (Tag 5, 21 und 90) für das EDV von $65,1\mu\text{l}\pm 1,7$ und das ESV von $32,3\mu\text{l}\pm 1,09$ und für die SHAM WT Mäuse ein EDV von $67,1\mu\text{l}\pm 1,36$ und ein ESV von $33,8\mu\text{l}\pm 0,38$.

Beim Vergleich der LAD ligierten Gruppen NLRP10^{-/-} und WT mit den SHAM operierten Mäusen ist der in der Literatur beschriebene signifikante Unterschied zu allen Bildgebungszeitpunkten darstellbar (Pfeffer und Pfeffer 1987). An den signifikant gestiegenen Volumina von EDV und ESV ist die Dilatation des linken Ventrikels post MI im Gegensatz zu den sich normal entwickelnden Herzkammern der SHAM operierten Gruppen zu erkennen.

Die Quantifizierung des EDV und ESV anhand der MRT Messung wird in der Literatur als Goldstandard beschrieben (Stegger et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit wurden die Werte für EDV und ESV mit dem Program Munich

Heart/MRI[®] berechnet.

Trotz fehlender Vergleichsmöglichkeiten des NLRP10 defizienten Krankheitsmodells verhalten sich die SHAM Gruppen und die operierten Gruppen wie in der Literatur beschrieben.

2.3. Signifikante Funktionalitätsabnahme von NLRP10^{-/-} in der LVEF

Nach einem linksventrikulären MI kann es zu einem Verlust der Funktionalität des linken Ventrikels kommen (Ross et al. 2002). Durch den Umbau des ehemals funktionstüchtigen Herzmuskelgewebes in eine bindegewebige Narbe, wird die Kontraktilität der linken Herzkammer herabgesetzt. Dieser Verlust der Kontraktilität äußert sich in einer verminderten Pumpleistung, also einer Abnahme der LVEF. Eine niedrige LVEF ist einer der entscheidenden Faktoren für das Entstehen eines chronischen Herzversagens (Cohn et al. 2000). Somit ist die LVEF einer der wichtigsten Parameter zur Beurteilung der Herzfunktion nach einem MI.

Beim Vergleich der NLRP10^{-/-}-Gruppe und der WT Mäuse konnte zu keinem der Bildgebungszeitpunkte (Tag 5, Tag 21, Tag 90) ein signifikanter Unterschied bezüglich der LVEF festgestellt werden. Der Vergleich der unterschiedlichen Zeitpunkte (Tag 5, 21 und 90), zeigte innerhalb der NLRP10^{-/-}-Gruppe auf Grund einer geringeren Streuung der Daten (Homogenität) eine signifikante Abnahme der LVEF (NLRP10^{-/-} Tag 5 vs Tag 21: $p=0,003$ und Tag 5 vs Tag 90: $p=0,005$). Bei den WT Mäusen zeigte sich ebenfalls beim Vergleich der unterschiedlichen Zeitpunkte eine Abnahme der LVEF, diese war aber auf Grund der größeren Streuung der Daten nicht signifikant (WT Tag 5 vs Tag 21: $p=0,234$ und Tag 5 vs Tag 90: $p=0,254$). Es konnte zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden (ungepaarter t-Test). Bei der Berechnung der Signifikanz innerhalb der Gruppe (gepaarter t-Test) konnte bei den NLRP10 Mäusen eine signifikante Abnahme der LVEF festgestellt werden, siehe dazu Abbildung 35 (Darstellung des Studienverlaufs jeder einzelnen Maus).

Dies lässt sich möglicherweise folgendermaßen begründen: Im Gegensatz zur Gruppe der WT Mäuse zeigte die NLRP10^{-/-} Gruppe eine homogene Reduktion der LVEF; alle Mäuse verschlechterten sich in der LVEF von Tag 5 auf Tag 21 bzw. von Tag 5 auf Tag 90. Bei der Gruppe der WT Mäuse zeigte sich hingegen

ein inhomogener Verlauf der LVEF; manche der Mäuse haben an Tag 5 eine schlechtere und manche eine bessere EF als an Tag 21 bzw. 90. Dies führt zu einem statistisch signifikanten Unterschied der LVEF in der NLRP10^{-/-} - Gruppe zwischen Tag 5 und Tag 21 bzw. zwischen Tag 5 und Tag 90.

Dass kein statistisch signifikanter Unterschied in der LVEF zwischen den Gruppen (also NLRP10^{-/-} - Gruppe vs WT-Gruppe) nachgewiesen werden konnte, ist in der, in dieser ersten explorativen Studie verwendeten geringen Tieranzahl, begründet.

Die homogene und signifikante Abnahme der LVEF bei den NLRP10 defizienten Mäusen könnte ein möglicher Hinweis darauf sein, dass NLRP10 in vivo eine protektive Rolle nach einem MI spielt. In vitro wurde bereits die Hypothese einer protektiven antiinflammatorischen Funktion von NLRP10 von der Forschergruppe um Wang aufgestellt (Wang et al. 2004, Imamura et al. 2010). In vivo Studien eines MI Modells mit NLRP10 defizienten Mäusen sind bisher jedoch nicht veröffentlicht.

Um sicherzugehen, dass die Gruppe der NLRP10^{-/-} Mäuse nicht unabhängig von der LAD-Ligation eine unterschiedliche LVEF im Vergleich zu WT-Mäusen aufweisen, wurden die beiden SHAM operierten Gruppen generiert und verglichen. Weder SHAM NLRP10^{-/-} noch SHAM WT-Mäuse zeigten zu einem der Bildgebungszeitpunkte signifikante Unterschiede hinsichtlich der LVEF (SHAM NLRP10^{-/-} Tag 5: 48,8%±5,6, Tag 21: 48,7%±5,7, Tag 90: 48,9%±6,8 und SHAM WT Tag 5: 52,3%±3,9, Tag 21: 48,3%±5,3, Tag 90: 49,8%±2,6). Die Ergebnisse der SHAM operierten Gruppen zeigten somit, dass ohne induzierten MI kein Unterschied hinsichtlich der Pumpleistung von NLRP10^{-/-} und WT-Tieren bestand.

Wegen nicht vorhandener Vergleichsstudien in der Literatur, können die in dieser Arbeit generierten Daten nicht durch andere Studien belegt werden. Es gibt allerdings Studien, die auch KO Krankheitsmodelle post MI vergleichen, z. B. die Caspase 1 (CASP1) defizienten Mausmodelle von verschiedenen Arbeitsgruppen (Toldo et al. 2013, Frangogiannis 2015). Es handelt sich bei diesen Studien nicht um ein NLRP10^{-/-} KO Krankheitsmodell, sondern um ein CASP1 KO Modell. Die Deletion von CASP1 führt nach einem MI zur Inhibition von Il1 β , was letztendlich zu einer verminderten Inflammation post MI führt. CASP1 KO

Mäuse liefern signifikant bessere LVEF Ergebnisse als die Kontrollgruppe (Toldo et al. 2013). CASP1 ist somit ein negativer Regulator post MI.

Die Bestimmung der LVEF mittels MRT gilt als Goldstandard, sowohl in der Humanmedizin als auch in der Präklinik (Redfors et al. 2012). Durch etablierte und standardisierte Protokolle und den jeweils gleichen Personen, die die MRT Messungen und -Auswertungen durchführen, ist es möglich, seriell sehr gute vergleichbare Ergebnisse zu erzielen. Generell ist das MRT die Standard-Bildgebungsmodalität zur Messung von Verlaufsstudien (Ross et al. 2002). Im Gegensatz zur Echokardiographie ist es bei der MRT durch EKG-Triggerung und Filterung der Atmung mit einem Atemsensor möglich, trotz der hohen Herzfrequenz von bis zu 600 Schlägen pro Minute, hochauflösende und seriell vergleichbare MRT Bilder zu produzieren. Auch die Auswertung der MRT Bilder mit dem Programm Munich Heart/MR[®] ist weitestgehend automatisiert und wurde stets von der gleichen Person ‚geblindet‘ durchgeführt.

Die Bestimmung der LVEF durch die nicht invasive multimodale molekulare Bildgebungsmodalität MRT kann durch etablierte Protokolle und validierte Software als ausgezeichnete Methodik der LVEF-Quantifizierung bezeichnet werden.

2.4. Vergleichbare Infarktgröße zwischen NLRP10^{-/-} und WT Mäusen

Zu keinem der Bildgebungszeitpunkte konnte bei der Bestimmung der Infarktgröße ein signifikanter Unterschied zwischen NLRP10^{-/-} und der Kontrollgruppe gezeigt werden. Ein wichtiger Ausgangspunkt für die Vergleichbarkeit der Infarktgrößen ist die gleiche OP-Methodik und eine möglichst gleiche Infarktgrößeninduzierung bei den beiden Mausgruppen. Da alle Mäuse von ein und derselben Person geblindet und nach der gleichen Operationsmethodik operiert wurden, und sich die Infarktgröße an Tag 5 zwischen beiden Gruppen nicht signifikant unterschieden hatte (NLRP10^{-/-}: 27,2%±11,04, WT: 33,4%±12,68), kann von einer vergleichbaren Induzierung der Infarktgröße ausgegangen werden.

Im weiteren Studienverlauf veränderten sich die Infarktgrößen bei den NLRP10^{-/-} Mäusen nur geringfügig (Tag 21: 27,8%±11,04 und Tag 90: 28,3±). Bei der WT Gruppe war ein moderater Anstieg zu beobachten (Tag 21: 27,8%±13,38 und Tag

90: $38\% \pm 7,78$). Da dieses Krankheitsmodell noch nie in einer MI Studie verwendet wurde, gibt es, genau wie bei den vorherigen diskutierten Ergebnissen der NLRP10^{-/-} Mäuse, keine in der Literatur beschriebenen Vergleichswerte bezüglich der Infarktgröße. Die Deletion des NLRP10 Gens scheint sich in Bezug auf die Infarktgröße nicht negativ oder positiv auf die NLRP10 defizienten Mäuse auszuwirken. Es konnte zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe festgestellt werden.

NLRP3 defiziente Mäuse, die ebenso zur Gruppe der NLRs gehören, zeigten unterschiedliche Ergebnisse. Viele Studien beschäftigten sich mit dem Verhalten von NLRP3 defizienten Mäusen in einem MI Modell. Kawaguchi et al. veröffentlichte 2011 eine Studie, in der die Gruppe beweisen konnte, dass NLRP3 defiziente Mäuse signifikant kleinere Infarktgrößen im Vergleich zu ihren Kontrollen post MI ausbildeten (Kawaguchi et al. 2011). Die Forscher konnten die Aktivierung des Inflammasoms und die IL-1 β Produktion während eines MIs feststellen. Im Gegensatz zu NLRP10 sind bei NLRP3 Aktivierung, Interaktionspartner und vor allem die Wirkungsweise bereits bekannt. Jedoch wurden bisher weder die Aktivierung noch die Zellen, mit denen NLRP10 interagiert, identifiziert. Zusätzlich weist NLRP10 keine erhöhte Inflammasomaktivität auf (Eisenbarth et al. 2012) und die Funktionsweise des Proteins bleibt unklar (Krishnaswamy et al. 2015). Aktuell werden diese Fragestellungen von PD Dr. O. Groß und seiner Arbeitsgruppe, die auch die NLRP10^{-/-} defizienten Mäuse generierten, untersucht. Diese Studie sollte die kardiovaskulären Aspekte im Rahmen eines induzierten MIs aufarbeiten und Aufschluss über die Auswirkung von NLRP10^{-/-} Mäusen bezüglich des linksventrikulären Remodelings geben.

Die Daten zur Berechnung der Infarktgrößen wurden mittels PET erhoben. Die [¹⁸F]FDG PET ist der Goldstandard für die Ermittlung myokardialer Parameter, wie der myokardialen Vitalität, sowohl bei Tiermodellen als auch in der Humanmedizin (Redfors et al. 2012). Die aktive Aufnahme von [¹⁸F]FDG durch gesunde Kardiomyozyten im Herzen erlaubt eine genaue Größenbestimmung des Infarktareals, welches keine oder eine deutlich reduzierte [¹⁸F]FDG-Aufnahme aufweist. Der für die Bildgebung verwendete Kleintier Inveon PET Scanner der Nuklearmedizinischen Klinik liefert trotz der limitierenden Herzgröße der Maus hochauflösende Bilder. Durch spezielle Rekonstruktionen wird eine optimale Bildqualität sichergestellt (de Kemp et al. 2010). Geschultes Personal und speziell

abgestimmte Abläufe während der Bildgebung sind ebenso wichtig, wie der Scanner und die Rekonstruktionen (Kramer et al. 2010). In der Literatur wird das Fehlen von geschultem Personal oft als Fehlerquelle beschrieben. Durch speziell geschulte Fachkräfte, die in der Nuklearmedizinischen Klinik ausschließlich am Kleintier PET Scanner arbeiten und die Bilder auch rekonstruieren, ist versucht worden diese Fehlerquelle auf ein Minimum zu reduzieren.

Die Apparatur und die benötigten Tracer, von denen einige einen on-site Zyklotron voraussetzen, sind bei der PET sehr viel kostenaufwendiger als z. B. die in der Literatur oft verwendete Ultraschalldiagnostik. Geschultes und erfahrenes Personal ist bei jeder Bildgebungsmodalität vorauszusetzen. Die Ultraschalldiagnostik ist in seiner Auswertung limitiert. Zur Determination der Infarktgröße ist keine spezielle Methode verfügbar (Kramer et al. 2010). Ein weiterer negativer Aspekt der Ultraschalldiagnostik ist die hohe intra- und interobserver Variabilität (Tanaka et al. 1996). Da die meisten Institute keinen Zugang zu einem Kleintier PET Scanner oder einem Kleintier MRT haben, bleibt der Ultraschall trotzdem eine wichtige und weitverbreitete Methode zur Quantifizierung der Funktionen des linken Ventrikles post MI.

Die Infarktgröße wurde in dieser Studie mittels PET ermittelt, zusätzlich wurde von sechs Herzen eine histologische Auswertung der Infarktgröße durchgeführt. Wie in Punkt 4 der Ergebnisse beschrieben, korrelieren die verglichenen Infarktgrößen sehr gut. Die hochsignifikante Korrelation der Daten ($R^2=98\%$) dieser beiden Methoden spricht für eine gute und präzise Durchführung der PET Bildgebung.

Die Validierung der Infarktgröße durch die multimodale molekulare Bildgebungsmodalität PET kann, sofern alle technischen und personellen Fehlerquellen so gut wie möglich vermieden werden, als ideale Methode der Infarktgrößenquantifizierung bezeichnet werden.

2.5. Vergleichbares KGW/HGW/TL über den gesamten Studienverlauf

Mit dem Vergleich des KGW, des HGW und der TL zwischen NLRP10-/- und der Kontrollgruppe konnte gezeigt werden, dass sich die beiden Gruppen in der

körperlichen Entwicklung nach einem MI nicht unterscheiden. Nach MI Induzierung bei der veränderten Mauslinie bestehen keine Unterschiede hinsichtlich des Herzgewichts bzw. der Körperentwicklung. Dieses Ergebnis ist für die Betrachtung der Daten aus der Bildgebung bedeutend. Nur mit einer vergleichbaren Körperentwicklung lassen sich auch die Funktionsparameter (wie Infarktgröße, EDV/ESV und LVEF) nach einem MI vergleichen.

Die Literatur beschreibt einen signifikanten Unterschied des HGWs zwischen LAD ligierten und SHAM operierten Mäusen (Yang et al. 2002). Dieser signifikante Unterschied konnte in dieser Arbeit ebenfalls gezeigt werden. Am Tag 90 zeigte die Messung des HGWs zwischen den beiden SHAM operierten Gruppen und den LAD ligierten Mäusen einen signifikanten Unterschied, SHAM NLRP10^{-/-}: 0,138g±0,010 vs NLRP10^{-/-}: 0,225g±0,070, p=0,05 und SHAM WT: 0,146g±0,009 vs WT: 0,188g±0,30, p=0,05. Das KGW und die TL der Gruppen unterschieden sich hingegen nicht.

Da sich SHAM NLRP10^{-/-} und SHAM WT untereinander in keinem der erhobenen Parameter unterschieden, bestätigt sich die Hypothese von vergleichbaren Mausgruppen hinsichtlich der Körperentwicklung ausgehen zu können.

3. Ausblick

In dieser Studie konnten die modernsten und geeignetsten multimodalen, molekularen Bildgebungsmodalitäten zur Darstellung des kardialen Remodelings nach einem MI bei NLRP10^{-/-} und WT Mäusen genutzt werden.

Da in dieser Arbeit das NLRP10^{-/-} Krankheitsmodell erstmalig in einem LAD Ligationsmodell verwendet wurde, gibt es keine Vergleichswerte der gewonnenen Parameter. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf die Annahme hin, dass das NLRP10^{-/-} als erstes Protein der Gruppe der NLRs mögliche antiinflammatorische und somit protektive Effekte in vivo zeigt (Imamura et al. 2010). NLRP10 scheint bei einem post myokardialen Prozess gewisse protektive Eigenschaften zu besitzen. Es konnte gezeigt werden, dass NLRP10^{-/-} defiziente Mäuse eine signifikant erhöhte Mortalität post OP im Vergleich zu den WT Mäusen aufwiesen und dass innerhalb der Gruppe der NLRP10^{-/-} eine homogen

signifikante Funktionalitätsabnahme der LVEF festgestellt werden konnte. Dies könnte ein Hinweis auf den fehlenden antiinflammatorischen Effekt von NLRP10 bei den NLRP10 defizienten Mäusen sein.

Um die in dieser Studie erhobenen Daten zu bestätigen, sind weitere MI Studien mit dem Mausmodell NLRP10^{-/-} nötig. Besonders die erhöhte Mortalität der NLRP10^{-/-} Mäuse post OP muss in weiteren Studien histopathologisch aufgearbeitet werden.

Durch effektive Durchführung und etablierte Protokolle aller genutzten Bildgebungsmethoden konnten aus tierschutzrechtlichen Gründen die verwendeten Tierzahlen auf ein Minimum reduziert werden. Die Etablierung dieser standardisierten Protokolle und die sehr gute Korrelation zwischen den einzelnen Bildgebungsmodalitäten ermöglichen in Zukunft eine weitere Reduzierung der Tieranzahl.

Ziel weiterer Studien sollte es zudem sein, die Übertragbarkeit der gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen und einen möglichen therapeutischen Ansatz post MI zu untersuchen. Das kardiale Remodeling post MI stellt noch immer die wichtigste Ursache für die Entstehung des chronischen Herzversagens dar (Sutton und Sharpe 2000). Aus diesem Grund ist das Vorantreiben der Eindämmung des Remodelings essentiell, um damit eine der weltweit häufigsten Todesursachen zu behandeln. Als Vorbild hierfür könnte die ‚Anakinra‘ Studie von A. Abbate von 2013 herangezogen werden (Abbate et al. 2013). In dieser Veröffentlichung ist die Pilotstudie der IL-1 Blockade mit dem Medikament Anakinra, welches die IL-1 Freisetzung hemmt, zur Prävention von kardialem Remodeling beschrieben. Abbate et al. hatten in den Jahren zuvor zahlreiche präklinische Studien mit einem CASP1-defizienten Mausmodell, welches die IL-1 Freisetzung fördert, veröffentlicht (Abbate 2013, Toldo et al. 2013, Van Tassell et al. 2013). So konnte die Gruppe um Abbate bestätigen, dass sich IL-1 negativ auf das kardiale Remodeling auswirkt und daraufhin einen Therapieansatz für den Menschen ausarbeiten.

Die im Rahmen dieser Arbeit gezeigte hohe Mortalitätsrate bei nicht signifikant unterschiedlicher Infarktgröße könnte eine erhöhte Sensibilität auf inflammatorische Vorgänge post MI bei NLRP10-defizienten Mäusen anzeigen. In weiteren Studien müssen insbesondere die histopathologischen und

immunologischen Aktivierungs- und Funktionsweise von NLRP10 geklärt werden, um mögliche Therapieansätze auf den Menschen zur Prävention des Remodelings nach einem MI weiter entwickeln zu können.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Evaluation des linksventrikulären Remodelings nach Myokardinfarkt in NLRP10^{-/-} Knockout Mäusen mittels MRT und PET

Das nach einem Myokardinfarkt (MI) entstehende Remodeling und die sich daraufhin entwickelnde chronische Herzinsuffizienz gehören unverändert zu den häufigsten Erkrankungen beim Menschen weltweit und weisen eine sehr hohe Morbidität sowie Mortalität auf. Es ist bislang nicht möglich, das Remodeling, das durch die Dilatation und den Verlust der Kontraktilität des linken Ventrikels gekennzeichnet ist, auf ein so geringes Maß zu reduzieren, dass die Entstehung eines chronischen Herzversagens unterbunden werden kann.

In dieser Studie wurde das Remodeling von NLRP10 defizienten Mäusen und deren WT Kontrollen anhand von Magnetresonanztomographie (MRT) und Positronenemissionstomographie (PET) Bildgebung untersucht.

Über das Nod-like receptor protein 10 (NLRP10), ein Protein das zur Gruppe der Nucleotide-Binding and Oligomerization Domain-like Receptors (NLRs) gehört, ist bislang keine Aktivierungs- oder Wirkungsweise bekannt. Es gibt in vitro Studien, die eine antiinflammatorische Wirkung des Proteins zeigen. Veröffentlichungen über das Remodeling post MI gibt es bislang nicht.

Die Gruppen der NLRP10^{-/-} und der WT Mäuse wurden einer permanenten left anterior descending artery (LAD) Ligation unterzogen, zudem wurde ein Teil jeder Gruppe (NLRP10^{-/-} und WT) scheinoperiert (SHAM). An Tag 5, 21 und 90 post OP wurde von allen Mäusen eine MRT und eine PET durchgeführt.

Mit Hilfe der Bildgebung konnten die Infarktgröße (%LV), das enddiastolische Volumen (EDV), das endsystolische Volumen (ESV) und die Auswurfraction (LVEF) bestimmt werden. Nach Ende des Versuchsdurchlaufes wurde von jeder Maus Körpergewicht (KGW), Herzgewicht (HGW) und die Tibialänge (TL) aufgezeichnet.

Es konnte eine signifikant erhöhte Mortalität der NLRP10^{-/-} Mäuse in den ersten vier Tagen post OP aufgezeigt werden. Bezüglich der Parameter Infarktgröße (%LV), EDV und ESV konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen dargestellt werden. Auch die Daten aus HGW, KGW und TL

zeigten keinen signifikanten Unterschiede zwischen NLRP10^{-/-} und WT Mäusen. Beim Vergleich der LVEF der NLRP10^{-/-}-Gruppe und der WT-Mäuse zu den Bildgebungszeitpunkten (Tag 5, Tag 21 und Tag 90) konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Der Vergleich der unterschiedlichen Zeitpunkte (Tag 5, Tag 21 und Tag 90), zeigte innerhalb der NLRP10^{-/-}-Gruppe auf Grund einer geringeren Streuung der Daten (Homogenität) eine signifikante Abnahme der LVEF. Bei den WT Mäusen zeigte sich ebenfalls beim Vergleich der unterschiedlichen Zeitpunkte eine Abnahme der LVEF, diese war aber auf Grund der größeren Streuung der Daten nicht signifikant.

Die Ergebnisse dieser Studie, vor allem die signifikant erhöhte Mortalität der NLRP10-defizienten Mäuse, geben einen Hinweis darauf, dass NLRP10 einen möglichen antiinflammatorischen Effekt in Bezug auf das kardiale Remodeling haben könnte. In weiteren Studien müssen insbesondere die histopathologischen und immunologischen Aktivierungs- und Funktionsweise von NLRP10 geklärt werden, um mögliche Therapieansätze auf den Menschen zur Prävention des Remodelings nach einem MI weiter entwickeln zu können.

VII. SUMMARY

Evaluation of left ventricular remodeling after permanent ligation in NLRP10^{-/-} knockout mice using MRI and PET

Left ventricular (LV) remodeling, the process after myocardial infarction (MI) by which the ventricular volume increases and the ejection fraction decreases, followed by chronic heart failure is still one of the top five death causes in the world. Due to the lack of effective therapeutic strategies to prevent chronic heart failure after MI, it is important to improve the understanding of the ongoing processes post MI in the left ventricle.

LV remodeling after permanent LAD occlusion was studied in NLRP10^{-/-} mice in comparison to littermate WT mice using MRT and PET.

Yet there is no activation or mechanism known about the protein nod-like receptor 10 (NLRP10) belonging to the nucleotide-binding and oligomerization domain-like receptors (NLRs). There are in vitro studies showing an antiinflammatory effect of NLRP10. Concerning the LV remodeling post MI, nothing has been published so far in the literature.

MI was induced by permanent LAD ligation. Also, a SHAM group without ligation of the LAD was investigated. Imaging was performed 5d, 21d and 90d post operation using an Inveon (Siemens) microPET/CT and a 7T GE/Agilent MR901 MRI.

Using these imaging modalities the following parameters could be determined: infarct size (%LV), enddiastolic volume (EDV), endsystolic volume (ESV) and ejection fraction (LVEF). After the last imaging time point body weight (KGW), heart weight (HGW) and tibia length (TL) were determined from each mouse.

A significantly increased mortality in NLRP10^{-/-} mice during the first four days post operation has been demonstrated. Furthermore the study showed a significant homogenous decrease of the LVEF in the NLRP10^{-/-} group compared to a inhomogenous decrease of the LVEF in the WT group. There were no differences in %LV, EDV/ESV or in KGW, HGW and TL.

The study confirmed the hypothesis that NLRP10 might have an antiinflammatory effect in cardiac remodeling after MI. Following studies should reproduce these

results and, as soon as the activation and mechanisms of action of NLRP10 are understood, new therapeutic strategies for the translation into humans to prevent left ventricular remodeling after myocardial infarction could be discussed.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Abbate A

The heart on fire: inflammasome and cardiomyopathy.

Exp Physiol. 2013; 98(2): 385

Abbate A, Dinarello CA

Anti-inflammatory therapies in acute coronary syndromes: is IL-1 blockade a solution?

European Heart Journal. 2014

Abbate A, Van Tassell BW, Biondi-Zoccai G, Kontos MC, Grizzard JD, Spillman DW, Oddi C, Roberts CS, Melchior RD, Mueller GH, Abouzaki NA, Rengel LR, Varma A, Gambill ML, Falcao RA, Voelkel NF, Dinarello CA, Vetrovec GW

Effects of interleukin-1 blockade with anakinra on adverse cardiac remodeling and heart failure after acute myocardial infarction [from the Virginia Commonwealth University-Anakinra Remodeling Trial (2) (VCU-ART2) pilot study].

Am J Cardiol. 2013; 111(10): 1394-1400

Abderrazak A, Couchie D, Mahmood DF, El Hage R, Vindis C, Laffargue M, Mateo V, Buchele B, Rubio Ayala M, El Gaafary M, Syrovets T, Slimane MN, Friguet B, Fulop T, Simmet T, El Hadri K, Rouis M

Anti-Inflammatory and Anti-Atherogenic Effects of the Inflammasome NLRP3 Inhibitor, Arglabin, in ApoE2.Ki Mice Fed a High Fat Diet.

Circulation. 2015

Abderrazak A, Syrovets T, Couchie D, El Hadri K, Friguet B, Simmet T, Rouis M

NLRP3 inflammasome: From a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases.

Redox Biology. 2015; 4: 296-307

Antman E, Bassand J-P, Klein W, Ohman M, Lopez Sendon JL, Rydén L, Simoons M, Tendera M

Myocardial infarction redefined—a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology committee for the redefinition of myocardial infarction: The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee*.

Journal of the American College of Cardiology. 2000; 36(3): 959-969

Bonvini RF

Inflammatory response post-myocardial infarction and reperfusion: a new therapeutic target?

European Heart Journal Supplements. 2005; 7(Suppl I): I27-I36

Brunner S, Todica A, Böning G, Nekolla SG, Wildgruber M, Lehner S, Sauter M, Übleis C, Klingel K, Cumming P, Franz WM, Hacker M

Left ventricular functional assessment in murine models of ischemic and dilated cardiomyopathy using [(18)F]FDG-PET: comparison with cardiac MRI and monitoring erythropoietin therapy.

EJNMMI Research. 2012; 2: 43-43

Bundesamt Statistisches

Todesursachen in Deutschland, Fachserie 12, Reihe 4, 2013.

Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2014

Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N

Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling.

J Am Coll Cardiol. 2000; 35(3): 569-582

Damm A, Lautz K, Kufer TA

Roles of NLRP10 in innate and adaptive immunity.

Microbes Infect. 2013; 15(6-7): 516-523

de Kemp RA, Epstein FH, Catana C, Tsui BMW, Ritman EL

Small-Animal Molecular Imaging Methods.

Journal of Nuclear Medicine. 2010; 51(Supplement 1): 18S-32S

Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJ, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, Stromberg A, van Veldhuisen DJ, Atar D, Hoes AW, Keren A, Mebazaa A, Nieminen M, Priori SG, Swedberg K, Guidelines ESCCfP

ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM).

Eur J Heart Fail. 2008; 10(10): 933-989

Dixon JA, Spinale FG

Myocardial remodeling: cellular and extracellular events and targets.

Annu Rev Physiol. 2011; 73: 47-68

Dobaczewski M, Gonzalez-Quesada C, Frangogiannis NG

The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction.

J Mol Cell Cardiol. 2010; 48(3): 504-511

Eisenbarth SC, Williams A, Colegio OR, Meng H, Strowig T, Rongvaux A, Henao-Mejia J, Thaïss CA, Joly S, Gonzalez DG, Xu L, Zenewicz LA, Haberman AM, Elinav E, Kleinstein SH, Sutterwala FS, Flavell RA

NLRP10 is a NOD-like receptor essential to initiate adaptive immunity by dendritic cells.

Nature. 2012; 484(7395): 510-513

Frangogiannis NG

The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling.

Nat Rev Cardiol. 2014; 11(5): 255-265

Frangogiannis NG

Interleukin-1 in cardiac injury, repair, and remodeling: pathophysiologic and translational concepts.

Discoveries (Craiova). 2015; 3(1)

Hedrich H

The Laboratory Mouse, Handbook of Experimental Animals.

Academic Press, Italy. 2004: 241-164

Hiller K-H, Waller C, Haase A, Jakob P

Magnetic Resonance of Mouse Models of Cardiac Disease.

In Semmler W and Schwaiger M: Molecular Imaging II Bd. 185/2, Springer Berlin Heidelberg, 2008

Imamura R, Wang Y, Kinoshita T, Suzuki M, Noda T, Sagara J, Taniguchi S, Okamoto H, Suda T

Anti-inflammatory activity of PYNOD and its mechanism in humans and mice.

J Immunol. 2010; 184(10): 5874-5884

J. Bogaert SD, and A. M. Taylor

Clinical Cardiac MRI.

Radiology. 2006; 241(3): 686-687

Joly S, Eisenbarth SC, Olivier AK, Williams A, Kaplan DH, Cassel SL, Flavell RA, Sutterwala FS

Cutting edge: Nlrp10 is essential for protective antifungal adaptive immunity against *Candida albicans*.

J Immunol. 2012; 189(10): 4713-4717

Kapoor V, McCook BM, Torok FS

An Introduction to PET-CT Imaging.

RadioGraphics. 2004; 24(2): 523-543

Kawaguchi M, Takahashi M, Hata T, Kashima Y, Usui F, Morimoto H, Izawa A, Takahashi Y, Masumoto J, Koyama J, Hongo M, Noda T, Nakayama J, Sagara J, Taniguchi S, Ikeda U

Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury.

Circulation. 2011; 123(6): 594-604

Klocke R, Tian W, Kuhlmann MT, Nikol S

Surgical animal models of heart failure related to coronary heart disease.

Cardiovasc Res. 2007; 74(1): 29-38

Kramer CM, Sinusas AJ, Sosnovik DE, French BA, Bengel FM

Multimodality Imaging of Myocardial Injury and Remodeling.

Journal of Nuclear Medicine. 2010; 51(Supplement 1): 107S-121S

Krishnaswamy JK, Singh A, Gowthaman U, Wu R, Gorrepati P, Sales Nascimento M, Gallman A, Liu D, Rhebergen AM, Calabro S, Xu L, Ranney P, Srivastava A, Ranson M, Gorham JD, McCaw Z, Kleeberger SR, Heinz LX, Muller AC, Bennett KL, Superti-Furga G, Henao-Mejia J, Sutterwala FS, Williams A, Flavell RA, Eisenbarth SC

Coincidental loss of DOCK8 function in NLRP10-deficient and C3H/HeJ mice results in defective dendritic cell migration.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2015; 112(10): 3056-3061

Kuwert T, Grünwald F, Haberkorn U, Krause T

Nuklearmedizin.

Thieme Verlag. 2007; 4., neu erstellte und erweiterte Auflage: 500

Kuwert T, Grünwald F, Haberkorn U, Krause T

Nuklearmedizin

Thieme Verlag. 2007; 4., neu erstellte und erweiterte Auflage: 500

Latz E

The inflammasomes: mechanisms of activation and function.

Current Opinion in Immunology. 2010; 22(1): 28-33

Lautz K, Damm A, Menning M, Wenger J, Adam AC, Zigrino P, Kremmer E, Kufer TA

NLRP10 enhances Shigella-induced pro-inflammatory responses.

Cell Microbiol. 2012; 14(10): 1568-1583

Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, Lee WP, Weinrauch Y, Monack DM, Dixit VM

Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP.

Nature. 2006; 440(7081): 228-232

Mohnike W, Hör G, Schelbert H

PET/CT-Atlas

Ein interdisziplinärer Leitfaden der onkologischen PET/CT-Diagnostik.

Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2006; 1

Ogura Y, Sutterwala FS, Flavell RA

The inflammasome: first line of the immune response to cell stress.

Cell. 2006; 126(4): 659-662

Pfeffer MA, Pfeffer JM

Ventricular enlargement and reduced survival after myocardial infarction.

Circulation. 1987; 75(5 Pt 2): Iv93-97

Protti A, Sirker A, Shah AM, Botnar R

Late gadolinium enhancement of acute myocardial infarction in mice at 7T: Cine-FLASH versus inversion recovery.

Journal of Magnetic Resonance Imaging. 2010; 32(4): 878-886

Rahmim A, Zaidi H

PET versus SPECT: strengths, limitations and challenges.

Nucl Med Commun. 2008; 29(3): 193-207

Redfors B, Shao Y, Omerovic E

Myocardial infarct size and area at risk assessment in mice.

Experimental & Clinical Cardiology. 2012; 17(4): 268-272

Rischpler C, Nekolla SG, Dregely I, Schwaiger M

Hybrid PET/MR imaging of the heart: potential, initial experiences, and future prospects.

J Nucl Med. 2013; 54(3): 402-415

Ross AJ, Yang Z, Berr SS, Gilson WD, Petersen WC, Oshinski JN, French BA

Serial MRI evaluation of cardiac structure and function in mice after reperfused myocardial infarction.

Magn Reson Med. 2002; 47(6): 1158-1168

Rowland DJ, Cherry SR

Small-animal preclinical nuclear medicine instrumentation and methodology.

Semin Nucl Med. 2008; 38(3): 209-222

Sandanger O, Ranheim T, Vinge LE, Bliksoen M, Alfsnes K, Finsen AV, Dahl CP, Askevold ET, Florholmen G, Christensen G, Fitzgerald KA, Lien E, Valen G, Espevik T, Aukrust P, Yndestad A

The NLRP3 inflammasome is up-regulated in cardiac fibroblasts and mediates myocardial ischaemia-reperfusion injury.

Cardiovasc Res. 2013; 99(1): 164-174

Saxena A, Russo I, Frangogiannis NG

Inflammation as a therapeutic target in myocardial infarction: learning from past failures to meet future challenges.

Transl Res. 2015

Schneider JE

Assessment of global cardiac function.

Methods Mol Biol. 2011; 771: 387-405

Schober O, Heindel W

PET/CT.

Thieme Verlag. 2007

; 1. Auflage: 336

Shigeoka AA, Mueller JL, Kambo A, Mathison JC, King AJ, Hall WF, Correia Jda S, Ulevitch RJ, Hoffman HM, McKay DB

An inflammasome-independent role for epithelial-expressed Nlrp3 in renal ischemia-reperfusion injury.

J Immunol. 2010; 185(10): 6277-6285

Sosnovik DE, Nahrendorf M, Weissleder R

Molecular Magnetic Resonance Imaging in Cardiovascular Medicine.

Circulation. 2007; 115(15): 2076-2086

Steg PG, James SK, Atar D, Badano LP, Lundqvist CB, Borger MA, Di Mario C, Dickstein K, Ducrocq G, Fernandez-Aviles F, Gershlick AH, Giannuzzi P, Halvorsen S, Huber K, Juni P, Kastrati A, Knuuti J, Lenzen MJ, Mahaffey KW, Valgimigli M, van't Hof A, Widimsky P, Zahger D, Bax JJ, Baumgartner H, Ceconi C, Dean V, Deaton C, Fagard R, Funck-Brentano C, Hasdai D, Hoes A, Kirchhof P, Knuuti J, Kolh P, McDonagh T, Moulin C, Popescu BA, Reiner Ž, Sechtem U, Sirnes PA, Tendera M, Torbicki A, Vahanian A, Windecker S, Hasdai D, Astin F, Åström-Olsson K, Budaj A, Clemmensen P, Collet J-P, Fox KA, Fuat A, Gustiene O, Hamm CW, Kala P, Lancellotti P, Maggioni AP, Merkely B, Neumann F-J, Piepoli MF, Van de Werf F, Verheugt F, Wallentin L

ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation.

The Task Force on the management of ST-segment elevation acute myocardial infarction of the European Society of Cardiology (ESC). 2012; 33(20): 2569-2619

Stegger L, Heijman E, Schäfers KP, Nicolay K, Schäfers MA, Strijkers GJ

Quantification of Left Ventricular Volumes and Ejection Fraction in Mice Using PET, Compared with MRI.

Journal of Nuclear Medicine. 2009; 50(1): 132-138

Sutton MGSJ, Sharpe N

Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction: Pathophysiology and Therapy.

Circulation. 2000; 101(25): 2981-2988

Tanaka N, Dalton N, Mao L, Rockman HA, Peterson KL, Gottshall KR, Hunter JJ, Chien KR, Ross J, Jr.

Transthoracic echocardiography in models of cardiac disease in the mouse.

Circulation. 1996; 94(5): 1109-1117

Tarnavski O, McMullen JR, Schinke M, Nie Q, Kong S, Izumo S

Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies.

Physiol Genomics. 2004; 16(3): 349-360

Thackeray JT, Bankstahl JP, Wang Y, Wollert KC, Bengel FM

Clinically relevant strategies for lowering cardiomyocyte glucose uptake for F-FDG imaging of myocardial inflammation in mice.

Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2014

Toldo S, Mezzaroma E, Van Tassell BW, Farkas D, Marchetti C, Voelkel NF, Abbate A

Interleukin-1beta blockade improves cardiac remodelling after myocardial infarction without interrupting the inflammasome in the mouse.

Exp Physiol. 2013; 98(3): 734-745

Tschopp J, Martinon F, Burns K

NALPs: a novel protein family involved in inflammation.

Nat Rev Mol Cell Biol. 2003; 4(2): 95-104

Turkington TG

Introduction to PET instrumentation.

J Nucl Med Technol. 2001; 29(1): 4-11

Van Tassell BW, Toldo S, Mezzaroma E, Abbate A

Targeting interleukin-1 in heart disease.

Circulation. 2013; 128(17): 1910-1923

Vanhoutte D, Schellings M, Pinto Y, Heymans S

Relevance of matrix metalloproteinases and their inhibitors after myocardial infarction: a temporal and spatial window.

Cardiovasc Res. 2006; 69(3): 604-613

Velagaleti RS, Pencina MJ, Murabito JM, Wang TJ, Parikh NI, D'Agostino RB, Levy D, Kannel WB, Vasan RS

Long-term trends in the incidence of heart failure after myocardial infarction.

Circulation. 2008; 118(20): 2057-2062

Wang Y, Hasegawa M, Imamura R, Kinoshita T, Kondo C, Konaka K, Suda T

PYNOD, a novel Apaf-1/CED4-like protein is an inhibitor of ASC and caspase-1.

Int Immunol. 2004; 16(6): 777-786

WHO

The top 10 causes of death.

World Health Organisation. 2012

Winter EM, Grauss RW, Atsma DE, Hogers B, Poelmann RE, van der Geest RJ, Tschope C, Schalij MJ, Gittenberger-de Groot AC, Steendijk P

Left ventricular function in the post-infarct failing mouse heart by magnetic resonance imaging and conductance catheter: a comparative analysis.

Acta Physiol (Oxf). 2008; 194(2): 111-122

Yang F, Liu YH, Yang XP, Xu J, Kapke A, Carretero OA

Myocardial infarction and cardiac remodelling in mice.

Exp Physiol. 2002; 87(5): 547-555

Zaragoza C, Gomez-Guerrero C, Martin-Ventura JL, Blanco-Colio L, Lavin B, Mallavia B, Tarin C, Mas S, Ortiz A, Egido J

Animal models of cardiovascular diseases.

J Biomed Biotechnol. 2011; 2011: 497841

Zeng Q, Lu D, Tang Q, Tian L, Wang H, Tang S, Hu C

Functional characterization of the p53 binding site in the human PYNOD promoter.

Hum Immunol. 2012; 73(4): 355-363

IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schematische Darstellung der NLR Gruppe, PYD: Pyrin Domain, CARD: Caspase-Activating and Recruitment Domain, NLR: Nucleotide-binding and Oligomerization Domain, LRR: Leucine-Rich Repeats, modifiziert nach Damm et al. (2013).	19
Abbildung 2: Zusammensetzung des NLRP3 Inflammasoms: CARD: Caspase Recruitment Domain, LRR: Leucine-Rich Repeat, NLR: Nucleotide Binding Domain, PYD: Pyrin Domain, CASP1: Cysteine-dependent-Aspartate-directed-Protease-1, modifiziert nach Abderrazak et al. (2015).	20
Abbildung 3: Wege der CASP1 Aktivierung: Pathogene und endogene Moleküle von geschädigten Zellen aktivieren durch das NLRP3 Inflammasom die Sekretion von IL-1 β , modifiziert nach Ogura et al. (2006).	21
Abbildung 4: Übersicht über die verschiedenen Gruppengrößen und Zeitpunkte der MRT und PET Bildgebung, die bei allen Gruppen durchgeführt wurden.	29
Abbildung 5: Timeline des Versuchablaufes.	30
Abbildung 6: Darstellung des Mäuseherzens. Das rote Kreuz kennzeichnet die Stelle der Ligatur der left anterior descending artery (LAD) für einen 30-40%-igen MI (Tarnavski et al. 2004).	32
Abbildung 7: Verwendete Materialien zur Intubation, 22 Gauge Venenverweilkanüle (Braun, Vasofix® Safety 22G), Nager Laryngoskop (Penn Century, Blade Assembly, Small Animal Laryngoscope Model LS-BA-M for mouse, USA), Beatmungsgerät (Mini Vent, Type 845, Hans Sachs Elektronik, Deutschland).	34
Abbildung 8: Desinfizierte und enthaarte Thoraxwand mit einem ca. 0,8cm langen Hautschnitt.	35
Abbildung 9: Eröffnen des Thorax und Eröffnen des Perikards.	35
Abbildung 10: Ligation der LAD-Arterie.	36
Abbildung 11: Verschluss des Thorax.	37
Abbildung 12 : Beispiel eines Scoring-Protokolls post OP.	39
Abbildung 13: MR-Volumenresonator-Insert (a) und die flexible Empfangsarray-Spule (b).	41
Abbildung 14: Narkosebox und Isoflurangerät.	41
Abbildung 15: Schwanzvenenkatheter und Anästhesieschlauch.	42

Abbildung 16: Setup der MRT Bildgebung mit mobilem Anästhesiegerät, Atemfrequenz Triggerung, EKG Ableitung und der Lage der Maus.	43
Abbildung 17: MRT 4-Kammerblick im Rahmen der Planungssequenzen.	44
Abbildung 18: Berechnung der LVEF durch die Darstellung der epi – und endokardialen Konturen in allen Schichten des linken Ventrikels anhand des Programms Munich Heart.....	46
Abbildung 19: Setup der PET Bildgebung mit Lage der Maus und der Atemfrequenz Triggerung.....	47
Abbildung 20: Beispiel der Infarktgrößenbestimmung der PET Bildgebung mit dem Programm Munich Heart/NM [®] ; es sind 2 Mausmessungen dargestellt.	49
Abbildung 21: Alternative Darstellung der berechneten infarzierten Fläche der PET Messungen, im Vergleich an Tag 5 und Tag 90 bei NLRP10-/- (a) und WT (b).....	50
Abbildung 22: Schnittbeispiel eines Herzen im Paraffinblock.....	51
Abbildung 23: Axiale Schnittebene des linken Ventrikels; die gelbe Linie zeigt die Konturen des gesunden Myokards, die schwarze Linie stellt den infarzierten Bereich des linken Ventrikles dar.	53
Abbildung 24: Axiale Schnittebene des linken Ventrikels; die gelbe Linie zeigt die Konturen des linken gesunden Myokards. In dieser Abbildung sind keine vom Infarkt betroffenen Areale dargestellt.	54
Abbildung 25: Korrelation der Infarktgrößen bei Histologie und PET (n=6).	55
Abbildung 26: Korrelation der LVEF von Person 1 vs Person 2, $R^2=0,8512$ (n=11).	56
Abbildung 27: Kaplan-Meier-Kurve; Überlebensrate (%) der WT (n=14) und NLRP10-/- (n=16) Mäuse post OP p=0,0009.....	59
Abbildung 28: Vergleich des EDV (a) und ESV (b) von NLRP10-/- (n=8) und WT (n=12), EDV; Tag 5 vs Tag 21 NLRP10-/- p=0,04, WT p=0,008; ESV NLRP10-/- p=0,02, WT p=0,01; Tag 5 vs Tag 90: NLRP10-/- p=0,25, WT p=0,07; ESV NLRP10-/- p=0,19, WT p=0,07; Tag 21 vs Tag 90: NLRP10-/- p=0,76, WT p=0,30; ESV NLRP10-/- p=0,84, WT p=0,29;	60
Abbildung 29: Vergleich des EDV (a) und ESV (b) an Tag 5: (EDV p=0,67, ESV p=0,96), Tag 21: (EDV p=0,96, ESV p=0,49) und Tag 90: (EDV p=0,24, ESV p=0,50) von NLRP10-/- (n=8) und WT (n=12).....	61
Abbildung 30: Vergleich des EDV an Tag 5, 21 und 90 von NLRP10-/- (n=8), SHAM NLRP10-/- (n=6) Tag 5: p=0,08, Tag 21: p= 0,01, Tag 90: p=0,05; WT	

(n=12) und SHAM WT (n=14)) Tag 5: p=0,00005 Tag 21: p= 0,0003, Tag 90: p=0,02.	62
Abbildung 31: Vergleich des ESV an Tag 5, 21 und 90 von NLRP10-/- (n=8), SHAM NLRP10-/- (n=6) Tag 5: p=0,04 Tag 21: p= 0,003, Tag 90: p=0,009; WT (n=12) und SHAM WT (n=14) Tag 5: p=0,000025 Tag 21: p= 0,00001, Tag 90: p=0,02.	63
Abbildung 32: Vergleich des EDV (a) (Tag 5: p= 0,09, Tag 21: p=0,18, Tag 90: p=0,09) und ESV (b) (Tag 5: p= 0,90, Tag 21: p=0,19, Tag 90: p=0,19) der beiden SHAM operierten Gruppen (SHAM NLRP10-/- n=6, SHAM WT n=14).	64
Abbildung 33: Vergleich der LVEF zwischen NLRP10-/- (n=8), WT (n=12) (NLRP10-/- vs WT Tag 5: p=0,22, Tag 21: p=0,07, Tag 90: p=0,22), SHAM NLRP10-/- (n=6) und SHAM WT (n=14) an Tag 5, 21 und 90 (SHAM NLRP10-/- vs SHAM WT Tag 5: p=0,16, Tag 21: p=0,92, Tag 90: p=0,83).....	65
Abbildung 34: Vergleich der LVEF zwischen NLRP10-/- (n=8) und WT (n=12) an Tag 5, 21 und 90 (NLRP10-/- Tag 5 vs Tag 21: p=0,003; Tag 21 vs Tag 90: p= 0,892; Tag 5 vs Tag 90: p=0,005; WT Tag 5 vs Tag 21: p=0,234; Tag 21 vs Tag 90: p= 0,819; Tag 5 vs Tag 90: p=0,254).	66
Abbildung 35: Darstellung der einzelnen Mäuse im Studienverlauf, NLRP10-/- (n=8) und WT (n=12).	66
Abbildung 36: Vergleich der Infarktgröße von WT (n=12) und NLRP10-/- (n=8) an Tag 5 (p=0,38), 21 (p=0,99) und 90 (p=0,18).....	67
Abbildung 37: Vergleichbare Infarktgröße an Tag 5 post OP bei beiden Gruppen (WT n=12, NLRP10-/- n=8, p=0,38).....	68
Abbildung 38: Vergleich des Körpergewichts von WT (n=12) und NLRP10-/- (n=8) an Tag 90 (p=0,54).....	69
Abbildung 39: Vergleich des Herzgewichts von WT (n=12) und NLRP10-/- (n=8) an Tag 90 (p=0,19).....	69
Abbildung 40: Vergleich der Tibiallänge von WT (n=12) und NLRP10-/- (n=8) an Tag 90 (p=1).	70
Abbildung 41: Vergleich des Herzgewichts an Tag 90 von NLRP10-/- (n=8) und SHAM NLRP10-/- (n=6) p=0,05; WT (n=12) und SHAM WT (n=14) p=0,05. ..	71
Abbildung 42 Vergleich des Körpergewichts (a) und der Tibiallänge (b) an Tag 90 NLRP10-/- (n=8), SHAM NLRP10-/- (n=6) (KGW: p=0,79, TL: p=0,44), WT (n=12) und SHAM WT (n=14) (KGW: p=0,58, TL: p=0,70).	72
Abbildung 43: Vergleich des Herzgewichts (p=0,33) von SHAM NLRP10-/-	

(n=6) und SHAM WT (n=14).....	73
-------------------------------	----

X. DANKSAGUNG

Frau Prof. Dr. med. vet. A. Meyer-Lindenberg danke ich für die Übernahme meiner Doktorarbeit an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwigs-Maximilians-Universität München.

Für die Möglichkeit der Durchführung meiner Doktorarbeit und die Anstellung an der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik des Klinikums Rechts der Isar danke ich Herrn Prof. Dr. med. M. Schwaiger.

Für die Betreuung meiner Arbeit und die Schnittstelle zwischen der TU München bzw. des Klinikums Rechts der Isar und der Tierärztlichen Fakultät danke ich Frau PD Dr. C. Baumgartner sehr herzlich. Vielen Dank für Ihre schnelle Durchsicht und konstruktiven Verbesserungsvorschläge meiner Dissertation.

Ein großer Dank gilt auch meinem Betreuer am Nuklearmedizinischen Institut Dr. med. C. Rischpler für die Einarbeitung in die OP-Methodik und die Hilfe bei sämtlichen Fragestellungen / Hindernissen während der Anfertigung der Arbeit.

Für die sehr gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung der NLRP10-/- Tiere und die Möglichkeit der Mitarbeit an einem so interessanten Thema möchte ich Herrn PD Dr. Olaf Groß und seiner Arbeitsgruppe danken.

Dem ganzen Team der präklinischen Forschung, speziell Sybille Reder, Michael Michalik und Dr. rer. nat. Stephan Nekolla, gilt mein besonderer Dank für die Hilfe bei der Etablierung der Protokolle und der Durchführung der Bildgebung. Dr. med. vet. K. Steiger danke ich für Ihre immer zur Verfügung stehenden Hilfe bezüglich der Histologie und die teils zeitlich sehr aufwendige Aufarbeitung der Präparate.

Herzlich bedanke ich mich bei Johanna Kock und meinem Mann Felix Bartels, die mir durch ihre Korrekturen und konstruktiven Anmerkungen bei der Fertigstellung der Arbeit sehr geholfen haben.